



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DIABETES TIPO II E RESOLVINAS D1

Trabalho submetido por
Isabel Alexandra Marques Batista da Silva
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Outubro de 2015



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DIABETES TIPO II E RESOLVINAS D1

Trabalho submetido por
Isabel Alexandra Marques Batista da Silva
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Professora Doutora Maria Fernanda de Mesquita

Outubro de 2015

Dedicatória

À minha mãe e à minha avó Dulce,
Que hão-de ser sempre os meus anjos da guarda.

Agradecimentos

Após cinco anos de dedicação e trabalho chegou o momento tão aguardado.

Em primeiro lugar, quero agradecer a ajuda e cooperação da minha orientadora, a Professora. Doutora Maria Fernanda de Mesquita pela paciência, pelo conhecimento que me transmitiu e ajuda prestada, tal como aos honrados Professores e restante Academia que contribuíram para a minha formação.

A todos os meus amigos e companheiros de curso. Este curso não se faz sozinho. É preciso amigos e colegas para nos ajudarem e estudarem connosco de maneira a alcançarmos todos o nosso objetivo. Destaco as mais próximas, como Filipa Cantiga, Catarina Silva, Inês Mouquinho, Joana Moreira, Ana Beatriz Guerreiro, Tânia Rodrigues, Sara Kittler, Sara Afonso, Rita Pires e a todos os outros que não tenho espaço para os citar, mas que estão no meu coração. Não é de sempre mas é para sempre. A todos eles, agradeço.

Gostaria de agradecer também ao Coro Académico Egas Moniz por me oferecer um escape onde a boa-disposição e a música ajudaram a que todo o trabalho árduo ficasse mais harmonioso.

E por fim, os mais importantes. Não existem palavras que demonstrem a minha gratidão a minha família, principalmente à minha mãe, Maria Marques, que tudo fez por mim. À minha Madrinha, Dulce Sá Silva e ao Tio António Pedro, que tanto me ajudaram. Ao meu irmão que sempre me apoiou e ajudou no que pôde e no que sabia. Aos meus avós, ao Avô Joaquim e à Avó Idalina, ao Avô Apolino e, para sempre, à Avó Dulce, que tanto queria presenciar este momento. Ao meu namorado que tanta paciência teve nesta última etapa. Espero que me acompanhem neste percurso que é a vida.

A Todos o meu sincero e grande Obrigado!

Saudações Académicas

Isabel Batista da Silva

Outubro de 2015

Resumo

A diabetes é um problema de saúde pública crescente com o envelhecimento da população, os maus hábitos alimentares e o sedentarismo. A obesidade poderá ser causa ou consequência da diabetes tipo II, sendo também um problema crescente de saúde pública.

Esta monografia tem como objetivo estudar, com base no conhecimento atual, se as resolvinas D1 são uma alternativa viável na terapêutica da diabetes tipo II.

A metodologia de pesquisa consistiu na procura de termos como “*Diabetes*”, “*Inflammatory Response*”, “*Inflammation*”, “*Resolvins*”, “*Specialized Pro-resolving Mediators*”, na base de dados *on-line PubMed* entre o período de Janeiro e Setembro de 2015.

Nesta monografia reviu-se a patogênese da diabetes tipo II, nomeadamente a hipoxia e a apoptose, a ativação das vias do JNK, do NF-kB e a produção da IL-1 β , induzidos pela hiperglicémia. Procurámos perceber como poderiam as resolvinas D1 atuar neste processo destacando-se a capacidade de regulação da movimentação trans-endotelial dos neutrófilos PMN, bloqueio de recetores *Toll-like*, ativadores de macrófagos e a redução da infiltração de leucócitos. Os resultados apresentados no estudo de Hellmann et al. demonstraram como atuam as resolvinas D1 na resistência à insulina, nas CLS dos macrófagos, no rácio entre o fenótipo M1 e M2 dos macrófagos, na expressão do recetor das resolvinas, nas células do tecido adiposo e, por último, na expressão de adiponectinas. Estes resultados são promissores, mas suscitam dúvidas, dado que ainda não se conhecem totalmente as resolvinas.

Neste trabalho as resolvinas D1 são propostas como um futuro da terapêutica da diabetes tipo II, sendo necessários mais estudos com evidência científica clara.

Palavras-chave: Diabetes Tipo II, Obesidade, Resolvinas D1 e Processo Inflamatório

Abstract

Diabetes is a rising public health problem due to population aging, inappropriate eating habits and sedentary lifestyle. There is a possibility of obesity being a cause or consequence of type II diabetes and it is also a growing public health problem.

This monograph has the objective of question if resolvins D1 will be an alternative to therapeutic of type II diabetes, based on the present knowledge.

The methodology of the research was based in searching words “Diabetes”, “Inflammatory Response”, “Inflammation”, “Resolvins”, “Specialized Proresolving Mediators”, on the online data base Pubmed between January 2015 and September 2015.

This monograph revised the pathogenesis of Type II diabetes, including hypoxia and apoptosis, the activation of the JNK pathway, the NF- κ B and the production of IL-1 α -induced hyperglycaemia. We tried to understand how the resolvins D1 could serve this process especially the ability to regulate the movement of the trans -endothelial PMN neutrophils, Toll-like receptor blockade, activators of macrophages and reduced leukocyte infiltration. The results presented in the study by Hellman et al. demonstrate how resolvins D1 act in insulin resistance, in CLS of macrophages, in the ratio between M1 and M2 phenotype of macrophages, in the expression of the receptor of the resolvins and finally, in the expression of adiponectins. These results are promising, but they raise some doubts, as resolvins are not fully known yet.

D1 resolvins are proposed in this work as a future treatment of type II diabetes, but further studies are necessary with clear scientific evidence

Keywords: Diabetes Tipo II, Obesity, Resolvins D1 and Inflammatory Response

Índice Geral

1. INTRODUÇÃO.....	15
CAPÍTULO I: DIABETES	19
1. A OBESIDADE COMO CAUSA PRINCIPAL DA DIABETES <i>MELLITUS</i> TIPO II	20
2. DIABETES COMO UMA DOENÇA INFLAMATÓRIA.....	21
2.1. <i>Inflamação nas Células-β Pancreáticas Diminui a Produção de Insulina</i>	<i>22</i>
2.2. <i>Inflamação do Tecido Adiposo Obeso Causa Resistência à Utilização Periférica da Insulina</i>	<i>23</i>
2.3. <i>Tecido Adiposo Obeso Recruta Células do Sistema Imunitário.....</i>	<i>24</i>
2.4. <i>A Inflamação na Diabetes Mellitus Tipo II.....</i>	<i>27</i>
2.4.1. Hipóxia.....	28
2.4.2. Morte Celular	28
2.4.3. Vias do JNK e NF-kB.....	29
2.4.4. IL-1, um Fator Stressante.....	31
2.4.5. Quimiocinas	33
2.4.6. Adipocinas.....	34
2.5. <i>A Diabetes Mellitus Tipo II como Alvo Anti-Inflamatório.....</i>	<i>34</i>
CAPÍTULO II: MEDIADORES INFLAMATÓRIOS.....	37
1. RESOLVINAS DA SÉRIE D	39
1.1. <i>Biossíntese das Resolvinas Série D e a Aspirina.....</i>	<i>40</i>
1.1.1 Ações.....	41
1.2. <i>Resolvinas D1</i>	<i>40</i>
CAPÍTULO III: AS RESOLVINAS E A TERAPÊUTICA.....	45
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	499

Índice de Figuras

Figura 1 – Evolução da prevalência da Diabetes entre 1958 e 2013, nos Estados Unidos da América	19
Figura 2 – Desenvolvimento da Inflamação na Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo II.....	27
Figura 3 – A Inflamação dos Ilhéus de Langerhans, induzida pela Interleucina-1 β , na Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo II.....	33
Figura 4 – Eicosanóides das Vias do Ácido Araquidónico e dos Ácidos Gordos Polinsaturados de Cadeia Longa Ómega-3.....	38
Figura 5 – Série D das Resolvinas	39
Figura 6 – Biossíntese da Série D das Resolvinas.	41

Lista de Abreviaturas

- 15-LO – 15-Lipo-oxigenase
- 15-PGDH – 15-hidroxiprostaglandina desidrogenase
- 17-HPDHA – 17- Hidroperóxido do Ácido Docosahexaeónico
- AA – Ácido Araquidódico
- AP-1 – Proteína Ativadora
- APN – Adiponectina
- AT-RvD – Resolvina D induzida pela Aspirina
- ATL – Lipoxina induzida pela Aspirina
- Bcl₂ – Regulador da Apoptose
- CCR2 – Recetor de Quimiocinas C do tipo 2
- CHO – Células de Ovários de Hámsteres Chineses
- CLS –Estruturas em Forma de Coroa dos Macrófagos
- COX – Ciclo-oxigenase
- CXCL1 – Quimiocina da Família CXC
- DHA – Ácido Docosahexaeónico
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- EOR – Eicosanoide Oxiredutase
- EPA – Ácido Eicosapentaenóico
- FAP – Fator de Ativação Plaquetária
- GPCR – Recetor copulado à proteína G
- GPR32 – Recetor órfão
- HDL – Lipoproteína de Alta Densidade
- HOMA - Modelo de Avaliação da Homeostase
- IκB – Proteína inibidor do NF-κB
- IL- Interleucina
- IL-1R1 – Recetor da Interleucina
- IL-1RA – Recetor Antagonista da Interleucina
- IM – Intramuscular
- IMC – Índice de Massa Corporal
- iNOS – Óxido Nítrico Sintetase
- IRS-1 – Substrato do Recetor da Insulina

- IV – Intravascular
- JNK – Quinase do terminal N da proteína N
- LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade
- LOX – Lipo-oxigenase
- LPA – Ácido Lisofosfatídico
- LTs – Leucotrienos
- MCP-1 – Proteína Quimiotática de Monócitos
- NF-kB – Fator Nuclear kappa B
- NLRP3 – Domínio 3 do Recetor Nod-like
- ORS – Espécies Reativas de Oxigénio
- PDX-1 – Gene Homeótico P pancreáticos e Duodenal
- PGs – Prostaglandinas
- PMN – Neutrófilos Polimorfonucleados
- PUFAs – Ácidos Gordos Polinsaturados
- RvD – Resolvinas da série D
- RvE – Resolvinas da série E
- SPM – Mediadores Lipídicos
- TLR – Recetor Toll-like
- TNF- α - Fator de Necrose Tumoral
- TXNIP – Proteína de Interação com a Tiorredoxina

1. Introdução

A diabetes tem-se tornado, cada vez mais, um problema de saúde pública. A urbanização dos territórios, o envelhecimento da população, os maus hábitos alimentares, uma vida de *stress* e sedentarismo têm levado a grandes mudanças no quotidiano das populações e a um aumento galopante da percentagem de prevalência da diabetes. (Guariguata et al., 2014).

Estes doentes e suas complicações, com 1.5-3% de risco aumentado de mortalidade face aos indivíduos normoglicémicos, revelam-se uma grande percentagem dos gastos dos sistemas de saúde das nações, sendo que em 2013, estimou-se que tenham sido gastos, pelo menos, 548,5 mil milhões de dólares, só nos Estados Unidos da América (Beagley et al., 2014). As autoridades de saúde por todo mundo têm-se deparado com a enorme necessidade de promover políticas e ações de prevenção e sensibilização para as populações atuais e futuras.

A obesidade poderá ser considerada causa ou consequência da diabetes tipo II. Estima-se que, na próxima década, haja um aumento anual de 2% na prevalência da obesidade (Siervo et al., 2014).

Neste contexto, muita investigação científica tem desenvolvido novos fármacos para controlar a doença e melhorar a qualidade de vida dos que da diabetes padecem. Muito avanço já foi conseguido, desde a produção de insulina através de técnicas que utilizam o RNA Recombinante, ao invés de se utilizarem animais como vetor, a grupos de fármacos inovadores como os inibidores da enzima DDP-4 (Dipeptidil peptidase 4). Dada a progressão da prevalência desta doença crónica, novas terapêuticas continuam em estudo. Sendo a diabetes *mellitus* tipo II uma doença inflamatória, os estudos mais recentes têm envolvido soluções terapêuticas mais vocacionadas para a inflamação.

Nos últimos anos, com a descoberta dos mediadores lipídicos, nomeadamente as resolvinas D1, e das suas atuações, tem-se pensado que estas moléculas biossintetizadas com o objetivo de resolução da inflamação poderem vir a ser o futuro da terapêutica anti-diabética, para o tipo II da doença, em insulínod dependentes e não-insulínod dependentes.

As questões de investigação que orientaram este estudo são “De que forma é a diabetes *mellitus* tipo II uma doença Inflamatória?”, “Como atuam as Resolvinas na

Inflamação?” e “Como poderiam as Resolvinas atuar no processo inflamatório da patogénese da Diabetes?”.

Com este trabalho pretende-se esclarecer se são as Resolvinas um caminho por onde vale a pena enveredar, no tratamento da diabetes tipo II, à luz dos conhecimentos adquiridos acerca da doença e destes mediadores lipídicos, essencialmente, na última década.

Esta monografia está organizada em três capítulos principais:

- I. No primeiro capítulo discute-se a diabetes, o conceito da doença, a obesidade como causa principal, as ligações entre a inflamação e a produção insuficiente de insulina, a resistência à utilização periférica da insulina e o recrutamento de células imunitárias para o tecido adiposo. Neste capítulo tentamos também perceber por que mecanismos a patogénese desta doença afeta as células, de forma a haver resistência à utilização da insulina e falência das células β pancreáticas. Por último, abordamos os pontos mais utilizados em estudos que tenham como alvo terapêutico a inflamação da diabetes tipo II.
- II. No segundo capítulo define-se o termo “Mediadores Lipídicos”, reflete-se sobre a origem das resolvinas da série D, como pode a aspirina influenciar a sua produção e o conhecimento da atuação das resolvinas D1.
- III. No terceiro capítulo pretende-se concluir acerca da questão principal desta investigação. Embora comecem a existir bastantes estudos acerca do alvo anti-inflamatório da diabetes, poucos são os que estudam esta mesma doença e os mediadores lipídicos, e mais escassos ainda são os estudos que se focam apenas nas resolvinas D1 relacionando-as com a diabetes tipo II. No caso, existe apenas um. Neste capítulo analisamos aprofundadamente esse estudo, tentando perceber o que foi provado e que fraquezas apresenta o estudo, esperando que no futuro mais e melhores investigações possam ser levadas a cabo.

Esta monografia assenta em revisão bibliográfica e análise documental.

A metodologia de pesquisa consistiu na procura de termos como “*diabetes*”, “*Inflammatory Response*”, “*Inflammation*”, “*Resolvins*”, “*Specialized Proresolving Mediators*”, cruzados com “*Resolvins D1*” na base de dados *on-line PubMed* entre o período de Janeiro e Setembro de 2015. Foram preferidos os artigos mais recentes entre os anos de 2005 e 2015. Excecionaram-se alguns mais antigos, importantes para

Introdução

evidenciar as descobertas e definições iniciais. Os dados de epidemiologia foram retirados do *site* da internet do INE e foram consultados alguns artigos científicos com estudos de prevalência, publicados em revistas científicas disponíveis. Para organização e gestão de citações e referências bibliográficas foi utilizado o programa *Zotero*[®], versão 4.0.28.8.

As palavras-chave deste trabalho são a Diabetes *Mellitus* Tipo II, a Obesidade, as Resolvinas D1 e o Processo Inflamatório.

Capítulo I: Diabetes

Em ascensão, os números de doentes com diabetes são preocupantes. Um estudo feito por Geiss et al., demonstrado na Figura 1, mostra a evolução da prevalência da doença, desde 1958 até 2013, nos Estados Unidos da América e o resultado revela que houve um aumento de 6,25% - 0,93% em 1958 e 7,18% em 2013 - da prevalência de diagnósticos da doença, durante esses 55 anos. Adicionalmente, aquando do início do estudo (1958) eram 1,6 milhões os diagnosticados com diabetes, face aos 22,3 milhões em 2013 (Geiss et al., 2014).

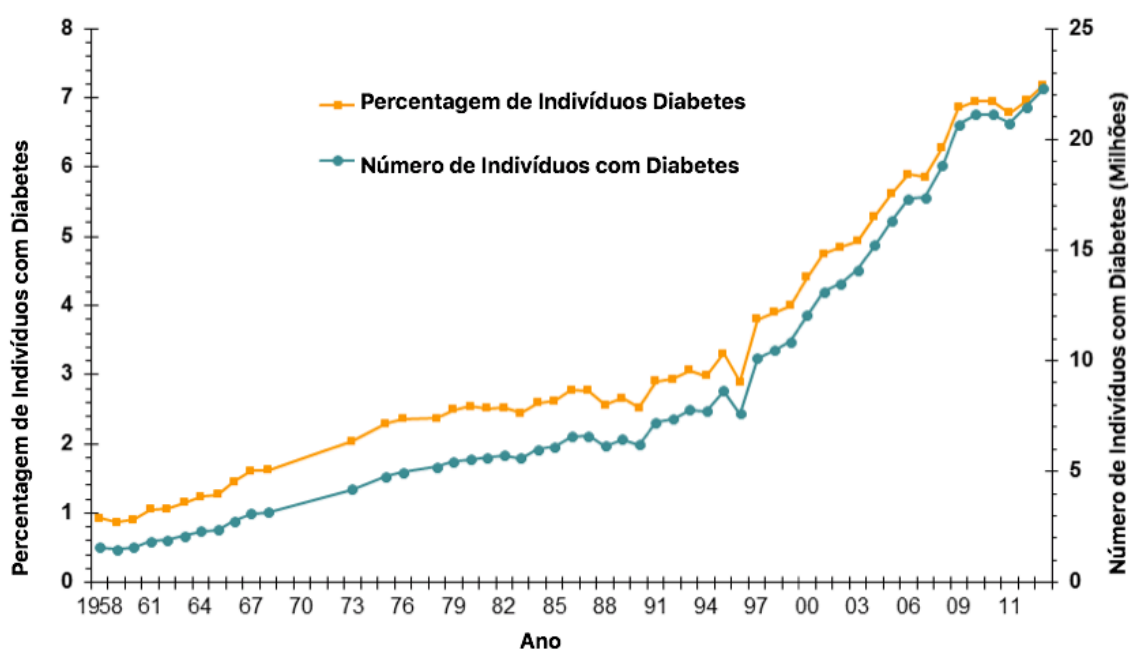


Figura 1 – Evolução da prevalência da Diabetes entre 1958 e 2013, nos Estados Unidos da América. Adaptado de (Geiss et al., 2014)

De acordo com a investigação de Guariguata et al., a prevalência da doença foi estimada em cerca de 318.8 milhões de pessoas, nos 219 países e territórios que estes investigadores estudaram. Estima-se que em 2035 este número suba para 591.9, um aumento de cerca de 55% em apenas 22 anos (Guariguata et al., 2014). O mesmo estudo mostrou que no nosso país, em 2013, 13% da população sofria de diabetes, casos diagnosticados e não diagnosticado (Guariguata et al., 2014). Em Portugal, esta doença foi a quarta causa de morte, em 2013, de acordo com Instituto Nacional de Estatística (INE, 2014).

A forma de atrasar, ou mesmo evitar, o aparecimento da diabetes *mellitus* tipo II é, de uma forma genérica, manter uma dieta saudável (rica em fibras, pobre em hidratos

de carbono e em ácidos gordos polissaturados), ter uma prática regular de exercício físico, manter de um IMC dentro dos parâmetros para a idade, sexo e altura, reduzir do consumo de sal, não ingerir bebidas alcoólicas e tentar a cessação tabágica.

A comunidade científica na globalidade considera a diabetes uma doença crónica do foro metabólico, em que há uma incorreta metabolização dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas, oriunda de um mau funcionamento do pâncreas, em que este produz em quantidade insuficiente a insulina (diabetes *mellitus* tipo I), ou quando há tolerância à atuação da insulina (diabetes *mellitus* tipo II). A polidipsia, a poliúria, a visão turva e a perda de peso são os sinais mais frequentes e imediatos que alertam para o diagnóstico médico ou o aviso para o paciente de que pode não estar a atuar corretamente no seu tratamento.

A doença pode, a longo-termo, conduzir a outras patologias secundárias, nomeadamente complicações microvasculares: retinopatias com eventual cegueira; nefropatias podendo resultar em insuficiência renal; neuropatias, com desenvolvimento de úlceras nos pés e/ou, paralelamente, a complicações macrovasculares, por exemplo, artropatia de Charcot e, em última instância, à amputação; a disfunção erétil também é um destes problemas que podem aparecer com a progressão desfavorável da doença.

1. A Obesidade como Causa Principal da Diabetes *Mellitus* Tipo II

Na diabetes *mellitus* tipo II, a obesidade é um dos fatores mais preponderantes no desenvolvimento da doença, sendo definida como um excesso de tecido adiposo que prejudica largamente a saúde e capacidade físicas, a interação e postura sociais e o bem-estar individual (Hellmann et al., 2011; Al-Goblan, Al-Alfi, & Khan, 2014). Atualmente, é um problema global que afeta tanto países desenvolvidos, como países em desenvolvimento. Tem merecido, por parte de algumas nações, grande investimento, no sentido de controlar esta doença que afeta a mobilidade, a morbilidade e a mortalidade (Al-Goblan et al., 2014).

A patogénese da diabetes *mellitus* tipo II consiste, como supramencionado, no desenvolvimento de resistência à utilização da insulina, acompanhada, na maioria dos casos, por declínio no desempenho da função células β dos ilhéus de Langerhans, do pâncreas. A obesidade relaciona-se com a diabetes, principalmente, pela contribuição para a resistência da insulina, dado que o tecido adiposo tem aumentada a secreção de inúmeras moléculas pró-inflamatórias como hormonas, glicerol, leptina, citocinas e

também ácidos gordos livres (Al-Goblan et al., 2014; Karpe, Dickmann, & Frayn, 2011). Estes últimos mostram-se bastante influentes no desenvolvimento de diabetes tipo II, dado que logo após um aumento dos níveis de ácidos gordos livres, surge a resistência à utilização da insulina. Elevados níveis destes ácidos gordos induzem a produção de insulina, aumentando o *stress* a que estão expostas as células β , que conduz ao aumento de libertação de ácidos gordos livres induzido pelos próprios (Al-Goblan et al., 2014). Cria-se assim um ciclo vicioso em que os ácidos gordos livres são prejudiciais ao funcionamento das células β .

A distribuição do tecido adiposo e o IMC pode ser um problema na resistência à utilização periférica da insulina. O tecido adiposo abdominal para além de prejudicial ao funcionamento dos órgãos, é indutor da resistência à insulina, não só porque afeta os recetores da insulina, mas também pelas moléculas pró-inflamatórias que secreta (Al-Goblan et al., 2014).

Num indivíduo saudável, há um feedback contínuo entre os tecidos utilizadores da insulina e as células que a produzem, as células β (Donath & Shoelson, 2011). Se esses tecidos (tecido adiposo, músculo e fígado) necessitarem de uma maior quantidade de glucose, as células β aumentam a produção de insulina; se houver uma estabilização na utilização da glucose, o desempenho das células β pode diminuir, para apenas manter os níveis basais da hormona. Células β saudáveis são capazes de lidar perfeitamente com este tipo de oscilações (Donath & Shoelson, 2011). Se pelo contrário, algum tipo de erro, falência ou defeito ocorrer neste processo leva ao desenvolvimento da Diabetes *Mellitus* Tipo 2. Porém, nem todos os obesos desenvolvem diabetes. Verifica-se a progressão da doença em indivíduos que já tenham uma predisposição natural (Al-Goblan et al., 2014). A obesidade é considerada causa ou consequência da diabetes *mellitus* tipo II.

2. Diabetes como uma Doença Inflamatória

Os primeiros registos de estudos feitos acerca da possível relação entre a diabetes e a inflamação datam de 1876 e 1901, quando Ebstein e Williamson verificaram que aquando da ingestão de doses elevadas de salicilatos resultavam na diminuição dos níveis de glicosúria em doentes diabéticos, evidenciando os potenciais efeitos benéficos destes fármacos no tratamento da doença (Williamson, 1901). Em 1957, Reid, levou estas descobertas mais além. Concentrou-se apenas no ácido acetilsalicílico e usou-o em

elevadas doses em doentes diabéticos. Concluiu que os níveis de glicemia melhoraram significativamente e, em pelo menos um caso, o doente deixou de ser insulínodépendente (Reid, Macdougall, & Andrews, 1957).

Pelo exposto, não se podem negar as evidências de que há efetivamente inflamação na diabetes. Contudo, o mecanismo de formação do processo inflamatório, nesta patologia, ainda não está totalmente compreendido. Suspeita-se que possam ser várias as vias pelas quais se dá a inflamação.

2.1. Inflamação nas Células- β Pancreáticas Diminui a Produção de Insulina

Os seguintes mecanismos consideram-se como principais causas da insuficiente produção de insulina, na diabetes *mellitus* tipo II: o *stress* oxidativo, deposição da proteína amiloide no pâncreas, lipotoxicidade – toxicidade associada a elevados níveis de ácidos gordos livres, e glucotoxicidade – toxicidade associada à hiperglicemia (Donath & Shoelson, 2011). Excetuando a deposição da proteína amiloide no pâncreas, supõe-se que estes mecanismos sejam também responsáveis pela resistência à utilização periférica da insulina e falência das células β pancreáticas, na produção da dita hormona. Cada um destes eventos em separado terá, acredita-se, o seu papel no desenvolvimento da inflamação dos tecidos (Donath & Shoelson, 2011). O *stress* oxidativo acontece quando há formação de espécies reativas de oxigénio, sob influência externa. A glucose é um dos mais influentes fatores para a produção destas ORS (*Oxygen Reactive Species* - Espécies Reativas de Oxigénio) (Poitout & Robertson, 2008). Particularmente no caso das células β do pâncreas, estas células são muito suscetíveis da atuação da glucose, reduzindo a sua capacidade de produção de insulina e podendo levar à apoptose das células (Donath & Shoelson, 2011). No estudo de Zraika et al., pequenos depósitos da proteína amiloide foram detetados, nos ilhéus de Langerhans, locais de produção da insulina, em diabéticos do tipo II. Contudo, a causa-efeito destas deposições ainda não está totalmente esclarecida (Zraika et al., 2010). Os ácidos gordos livres de cadeia longa estão presentes em elevadas concentrações séricas e aumentam a resistência à utilização periférica da insulina, a falência das células β e induzem a apoptose destas células dos ilhéus de Langerhans – processo denominado de Lipotoxicidade (Reaven et al., 1988; Unger, 1995; Walker et al., 1996; Maedler et al., 2001; Maedler et al., 2003). Prentki e Corkeys demonstraram que os ácidos gordos saturados são especialmente tóxicos e que os ácidos gordo mono-insaturados aparentam

ter uma ação de proteção, pois apresentaram resultados na prevenção da resistência à insulina (Prentki & Corkey, 1996). Do mesmo modo, a hiperglicemia induz as mesmas lesões, em que pequenas variações dos níveis diminuem a transcrição do gene da produção de insulina - glucotoxicidade (Bonner-Weir, Trent & Weir, 1983; Leahy et al., 1986; Donath et al., 1999; Kaneto et al., 2002; Weir & Bonner-Weir, 2004).

Nas células β pancreáticas de pacientes com diabetes tipo II foram reportadas elevadas quantidades de citocinas e quimiocinas, bem como de tecido inflamado, o que sugere a infiltração de células do sistema imunitário e, conseqüentemente, a existência de um processo inflamatório (Maedler et al., 2002; Maedler, 2004; Ehses et al., 2007).

Amostras de tecido dos ilhéus de Langerhans evidenciaram fibrose e depósitos da proteína amiloide, sendo que estes depósitos estimulam os macrófagos a secretarem IL-1 β , um importante mediador do processo inflamatório e indutor da apoptose (Dinarelli, 2009; Masters et al., 2010). Esta descoberta comprova a existência de inflamação, uma vez que a fibrose é uma consequência da presença de um processo inflamatório crônico (Masters et al., 2010).

2.2. Inflamação do Tecido Adiposo Obeso Causa Resistência à Utilização Periférica da Insulina

O tecido adiposo corporal não é todo igual. O tecido adiposo subcutâneo é diferente do abdominal/visceral e a presença deste último é mais prejudicial à saúde. Para além do tecido adiposo visceral afetar a funcionalidade dos órgãos, eles diferem no tamanho dos adipócitos, na atividade metabólica e na capacidade de induzir resistência à utilização da insulina (Shoelson, Lee & Goldfine, 2006).

No tecido adiposo visceral de um indivíduo obeso há um baixo nível, mas crônico, de inflamação, que conduz à resistência da utilização periférica da insulina e desenvolvimento de diabetes *mellitus* tipo II (Feuerer et al., 2009). Proteínas de fase aguda da inflamação foram encontradas em circulação, nos doentes com diabetes tipo II, nomeadamente a proteína C-reativa e a haptoglobina (Pickup et al., 1997; Spranger et al., 2003; C Herder et al., 2005; Christian Herder et al., 2009). Da mesma forma, moléculas como o TNF- α , IL-6, MCP-1, leptina, características da inflamação, foram encontradas nos tecidos adiposos de indivíduos obesos, estando a obesidade altamente ligada ao desenvolvimento da diabetes *mellitus* tipo II (Hotamisligil, Shargill & Spiegelman, 1993; Feuerer et al., 2009). O fator de necrose tumoral, uma dessas

moléculas, é produzido pelos adipócitos e prova a relação entre a inflamação e o desenvolvimento de resistência à utilização periférica da insulina e consequente progressão da diabetes tipo II (Hotamisligil et al., 1993). Inicialmente pensou-se que seria produzido apenas para proteção do próprio tecido adiposo, face à obesidade. Estudos recentes, mostraram a existência de macrófagos nos adipócitos e são eles que sintetizam a maioria dos fatores inflamatórios que estão aumentados na obesidade (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). Assim sendo, o aumento da produção dos macrófagos no tecido adiposo tem correlação com o grau de obesidade (Donath & Shoelson, 2011).

2.3. Tecido Adiposo Obeso Recruta Células do Sistema Imunitário

Tem sido de grande interesse o estudo e caracterização dos macrófagos presentes no tecido adiposo, sob diferentes condições: em animais e indivíduos obesos, magros, depois de uma rápida perda de peso e em lipodistrofia – estado em que a massa de tecido adiposo está bastante reduzida, quer a nível local quer de uma forma geral. Aparentemente, há uma relação entre a lipodistrofia e a obesidade. Embora tenham conceitos contrários, as consequências assemelham-se: dislipidémias, resistência à utilização periférica da insulina e potencial desenvolvimento de diabetes tipo II (Lumeng, DeYoung, et al., 2007; Herrero et al., 2010; Kosteli et al., 2010; Shaul et al., 2010).

O mecanismo pelo qual os macrófagos são recrutados é pertinente para se compreender que funções desempenham, no tecido adiposo. A proteína quimiotática de monócitos-1 (*Monocytes Chemoattractant Protein-1*, MCP-1) é produzida pelo tecido adiposo, em simultâneo e independentemente do crescimento dos adipócitos. Esta proteína vai recrutar os monócitos em circulação que expressem à sua superfície o recetor de quimiocinas C do tipo 2 (*C Chemokines Receptor-2*, CCR2). Esta MCP-1 tem influência na maturação dos monócitos a macrófagos, já no tecido adiposo” (Shoelson et al., 2006).

Os macrófagos têm, como é do conhecimento, diferentes características dependentemente do tecido em que se encontrem. No caso do tecido adiposo este fenómeno não é diferente (Donath & Shoelson, 2011). As ditas células encontradas neste tecido são maiores e polinucleadas, sugerindo que os macrófagos se fundem para melhor desenvolverem as suas funções (Shoelson et al., 2006). Inclusivamente, o

fenótipo de macrófagos encontrados no tecido adiposo de ratos magros não é igual ao de macrófagos encontrados no dito tecido de ratos de obesidade induzida. No caso dos ratos magros, os macrófagos pertencem ao fenótipo M2, expressam arginase 1 e IL-10 e são estimulados pela IL-4 ou pela IL-13, sendo que em situações de inflamação, estas moléculas tendem a ser resolutivas (Martinez & Gordon, 2014). Nos ratos com obesidade induzida, foram encontrados macrófagos do fenótipo M1, estimulados pelo Interferão- α e que sintetizam óxido nítrico (Martinez & Gordon, 2014). Em 2007, Lumeng et al. propõem que na transição de rato magro a rato obeso, também o fenótipo de macrófagos presentes no tecido adiposo se altera, de M2 para M1, respetivamente, e que os macrófagos M1 contribuem para a resistência à utilização periférica da insulina, resultando em Diabetes Tipo II (Lumeng, et al., 2007).

Embora os macrófagos sejam as células imunes encontradas em maior quantidade, no tecido adiposo, outras foram também descobertas comprovando a existência de um processo inflamatório no tecido adiposo, podendo este ser a principal causa de desenvolvimento da Diabetes Tipo II (Liu et al., 2009a). Estudos de Liu et al. em ratos, demonstraram que os mastócitos estão em número aumentado no tecido adiposo do rato obeso. Provaram, da mesma forma, que quando há uma deficiência na produção destas células, nomeadamente se houver uma mutação em que o gene KIT (um importante fator de crescimento, logo, responsável pela maturação dos mastócitos) seja eliminado, ou que quando há tratamento com cetotifeno (fármaco antiasmático que bloqueia as funções dos mastócitos, utilizados para tratamento da hiperreatividade brônquica), verifica-se uma melhoria na resistência à insulina comparativamente aos ratos *wild-type* ou sem tratamento com o fármaco (Liu et al., 2009b).

Crê-se que as células CD8⁺T e T_H contribuam, ainda que por meios ainda não totalmente elucidados, para a resistência da insulina e que as células T_{Reg} e as T_H2 (células dos sistema imunitário) a previnam (Feuerer et al., 2009; Nishimura et al., 2009; Ilan et al., 2010). Sabe-se, pelos estudos desenvolvidos por Nishimura et al., que quantidades significativas de células CD8⁺T e de macrófagos foram encontradas no tecido adiposo, e que uma alteração genética que eliminasse as células CD8⁺T, resultaria numa diminuição da quantidade de macrófagos encontrados, bem como numa melhoria do estado inflamatório e consequente melhoria da utilização da insulina (Nishimura et al., 2009). Relativamente às células T_{Reg}, está comprovado o seu importante papel na supressão de potenciais células reativas, como por exemplo células cancerígenas, revelando um papel protetor face às células que secretam moléculas pro-

inflamatórias (Baecher-Allan & Hafler, 2006; Roncarolo & Battaglia, 2007). Comparando os adipócitos do rato magro com o tecido adiposo do rato obeso, a proporção de células T_{Reg} no compartimento $CD4^+T$ está dramaticamente diminuída, e no caso do rato magro está aumentada. Este decréscimo da proporção de células T_{Reg} mostra que com a obesidade se perde capacidade de “controlar” o desenvolvimento da inflamação, até porque estas células expressam uma generosa quantidade de IL-10 (uma molécula anti-inflamatória) (Feuerer et al., 2009; Ilan et al., 2010).

2.4. A Inflamação na Diabetes Mellitus Tipo II

A inflamação é um processo chave no desenvolvimento da diabetes tipo II e a forma como este processo se desenvolve ainda não é motivo de consenso. Atualmente, supõe-se que seja através de um conjunto de acontecimentos, nomeadamente, através hipóxia, morte celular, pelas vias do NF-KB e da JNK, do IL-1 como fator stressante, das quimiocinas e, talvez por último, das adipocitocinas (Donath & Shoelson, 2011). Apresentamos, de seguida a Figura 2, onde podemos observar como a glucose e ácidos gordos ingeridos na dieta vão provocar um desequilíbrio no funcionamento do pâncreas, mais concretamente, nas células β dos ilhéus de Langerhans, o que leva à produção de citocinas e quimiocinas (IL-1 β , TNF- α , MCP-1, entre outros (Donath & Shoelson, 2011). As citocinas e as quimiocinas, vão posteriormente recrutar células do sistema imunitário, contribuindo assim para o desenvolvimento da inflamação. As citocinas e as quimiocinas que entram na corrente sanguínea vão induzir processos inflamatórios noutros tecidos, desenvolvendo-se um processo inflamatório crónico e sistémico (Donath & Shoelson, 2011).

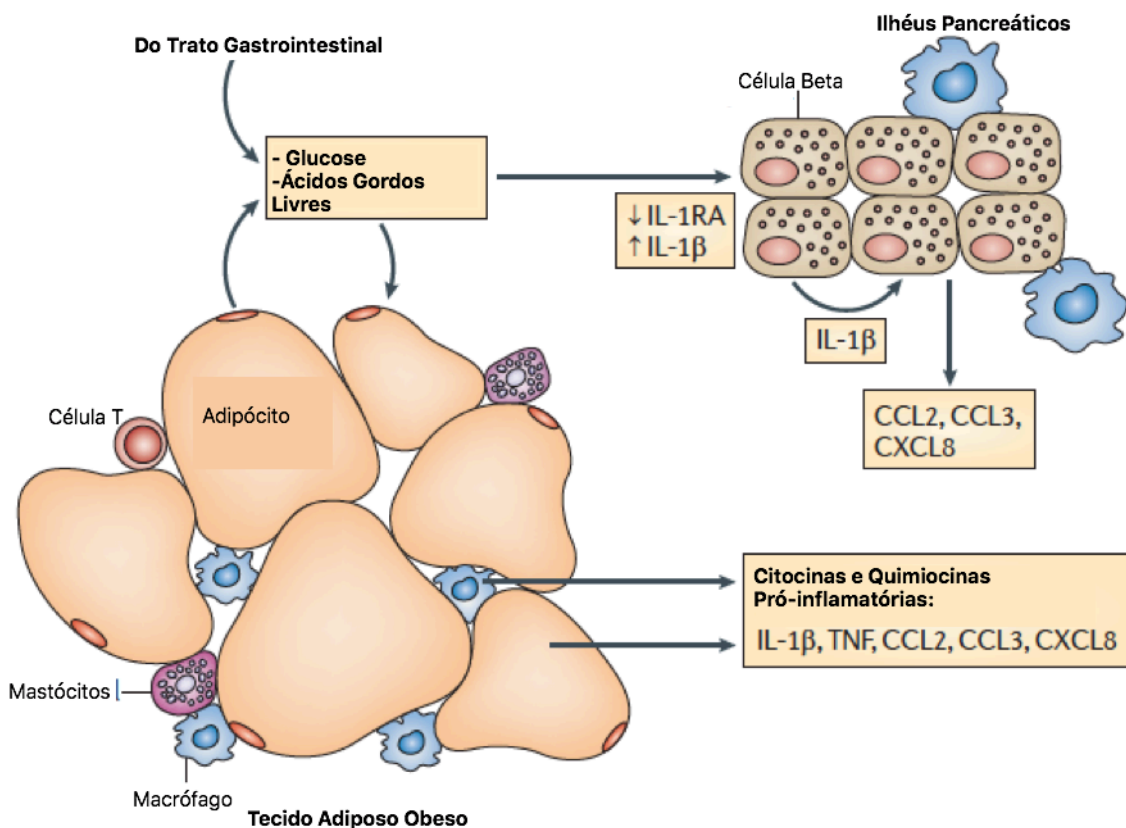


Figura 2 – Desenvolvimento da Inflamação na Diabetes Mellitus Tipo II. Adaptado de (Mark Y. Donath & Shoelson, 2011).

2.4.1. Hipóxia

A hipóxia surge quando há supressão do aporte de oxigênio. Em alternativa, dá-se a angiogênese induzida por vários fatores angiogénicos, como a angiogenina, fator de crescimento fibroblástico e o fator de transformação do crescimento (Adair & Montani, 2010). Sendo um tecido de crescimento relativamente rápido, faz sentido que a angiogênese esteja presente no tecido adiposo de um obeso.

Em 1999, Lewis verificou a acumulação de uma enorme quantidade de macrófagos em locais de hipóxia (Lewis, 1999). Por outro lado, a hipóxia induz a tradução de vários genes pro-angiogénicos e pro-inflamatórios, por exemplo o TNF- α , a IL-6 ou o MCP-1 (Burke et al., 2003; Strissel et al., 2007). Fica assim esclarecida uma das ligações entre o crescimento do tecido adiposo e a indução da inflamação.

2.4.2. Morte Celular

Aparentemente, o crescimento dos adipócitos favorece a morte das células dos próprios adipócitos, pela necrose das mesmas e também pelos macrófagos presentes que ao libertarem as citocinas, como TNF- α , óxido nítrico, ROS, induzem a morte celular dos adipócitos (Cinti et al., 2005; Donath & Shoelson, 2011). A cada “morte de adipócitos” corresponde um recrutamento massivo de macrófagos, assim mesmo uma baixa taxa de necrose celular deste tecido é suficiente para desencadear uma resposta inflamatória (Strissel et al., 2007). Durante a necrose dos adipócitos, estas células libertam o seu interior no espaço extracelular e a partir daí desenvolve-se uma resposta inflamatória, para eliminação desses detritos celulares (Cinti et al., 2005). Em 2005 um estudo desenvolvido por Cinti et al. ficou demonstrado que no tecido adiposo, os macrófagos estão localizados junto dos locais de necrose das células deste tecido, formando aglomerados de 12-15 macrófagos - as chamadas ‘Estruturas em Coroa’, tendo como principal função a de remover os detritos celulares, nomeadamente as partículas lipídicas. O aumento da frequência da morte dos adipócitos está relacionada com a obesidade em rato e humanos e no caso dos indivíduos obesos, a morte dos adipócitos propicia à recruta, infiltração e persistência dos macrófagos no tecido adiposo (Cinti et al., 2005). Em 2007, Lumeng et al., demonstraram que a morte dos adipócitos é um evento que relativamente rápido e progressivo, em relação à dieta

indutora de obesidade e que interfere com o recrutamento e troca de fenótipo dos macrófagos (do tipo M2 para o tipo M1), com a inflamação do tecido adiposo e com a resistência à insulina (Lumeng, Bodzin & Saltiel, 2007). No mesmo ano, Strissel et al., num estudo de 20 semanas a alimentar ratos com elevado teor de gordura, verificaram que há uma relação de proporcionalidade direta entre a quantidade de tecido adiposo e a respetiva morte celular do tecido, nas primeiras 12 semanas, havendo a hipótese de que também exista a mesma relação de proporcionalidade entre a quantidade de tecido adiposo e o número de macrófagos recrutados. A morte das células dos adipócitos e a respetiva eliminação dos detritos pelos macrófagos infiltrados no tecido adiposo são a proposta de que este processo seja uma forma de equilíbrio e que contribua para uma rápida substituição de novas células do tecido adiposo nos locais, anteriormente, necróticos (Strissel et al., 2007).

A inflamação das células β pancreáticas é uma ocorrência ainda mais rápida e acontece logo após as 8 semanas de alimentação com uma dieta rica em gordura, segundo o estudo de Ehse et al. (Ehse et al., 2007). Pensa-se, no entanto, que a inflamação não tenha que ver com o recrutamento de macrófagos pelas células β , uma vez que se sabe que estas células têm pouca importância nesse processo; poderá ser devido a quimioquinas derivadas dos ilhéus que são responsáveis pelo início do processo inflamatório (Donath & Shoelson, 2011).

2.3.4.3. Vias do JNK e NF- κ B

São vários os tipos de *stress* celular que podem levar à da ativação de várias vias de sinalização, JNK e NF- κ B por exemplo, nomeadamente a radiação ultra-violeta e γ , fármacos citotóxicos, choques de frio e de quente, hipo e hiperosmolaridade, citocinas pro-inflamatórias, ROS, desenvolvendo um processo inflamatório (Abdelli et al., 2004). Um elevado nível sérico de glucose, como fator indutor de várias destas lesões celulares, também é responsável pela ativação destas vias de sinalização. No caso da via da JNK, quinase Jun N-Terminal, conhecida como quinase induzida pelo *stress* é também ativada pelas citocinas (TNF e IL-6), fatores de crescimento e tem importância na apoptose de variadas células, em consequência de diversas agressões externas (Kaneto et al., 2002).

O fator de necrose tumoral também ativa a via JNK, através da fosforilação do c-JUN, um componente do fator de transcrição AP-1 (*Activator Protein-1*, uma proteína

ativadora-1) que por sua vez vai, em conjunto com a c-Fos, ligar-se ao DNA e regular a expressão de diversas citocinas (TFN- γ , TNF- α e IL6, por exemplo) (Bennett et al., 2001). Aguirre, Uchida et al., estudaram a ação do TNF- α na via do JNK em hámsteres, verificando, *in vitro*, que este se associa à IRS-1, Substrato do Recetor de Insulina-1 nas células CHO (*Chinese Hamsters Ovary* - células de ovário de hámsteres chineses) (Aguirre, Uchida et al., 2000). Esta associação não está completamente escrutinada, contudo pensa-se que possa ser por uma interação direta entre a JNK e o local da suposta ligação da JNK, na terminação carboxílica do IRS-1. O IRS-1, por sua vez, contém vários destes locais, sendo relativamente fácil à JNK se associar à IRS-1, desde que a quinase seja ativada (Aguirre et al., 2000). No limite, esta associação faz com que o IRS-1 seja fosforilado no resíduo serina, o maior local de fosforilação do IRS-1, em vez de o ser no resíduo tirosina, como em condições não patológicas (Hirosumi et al., 2002). Esta alteração vai induzir inibição do funcionamento do IRS-1, diminuindo a produção de insulina (Aguirre et al., 2000). De acordo com Kaneto et al., quando a JNK está a ser expressada há uma diminuição da atividade de ligação da PDX-1 (*Pancreatic and Duodenal Homeobox-1*, um fator transcricional que regula a expressão dos genes dos transportadores da glucose e da insulina, no pâncreas) ao DNA, sendo esta ligação importante na diferenciação, maturação e desenvolvimento das células β pancreáticas (Kaneto et al., 2002). Esta diminuição de ligação vai provocar um decréscimo na expressão do gene da insulina, o que leva à supressão da produção da mesma (Kaneto et al., 2002).

Tanto o TNF- α como os ácidos gordos livres podem ser ativadores da via da JNK e as espécies de oxigénio reativas induzidas por esta quinase são responsáveis por bloquear famílias de proteínas supressoras da apoptose - Bcl2 e Bcl_{XL} (Whitmarsh et al., 1998; Hirosumi et al., 2002). A JNK parece desenvolver um importante papel na resposta imunitária e a morte celular programada (Bennett et al., 2001). Bennet et al verificaram que quando é utilizado um inibidor da JNK há uma diminuição da glicemia e melhoria na resistência à insulina causadas por um aumento da produção e consequente quantidade sérica de insulina (Bennett et al., 2001)

A via do NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*, NF- κ B) também é desde há muito considerada uma via de sinalização característica de processos de inflamação (Lawrence, 2009). O NF- κ B é um fator de transcrição que se encontra no citosol na forma inativa, ligado à sua proteína inibidora - I κ B (que tem três subunidades: I κ B α /IKK1, I κ B β /IKK2 e I κ B γ /NEMO) é estimulada pelas citocinas que conduzem à

fosforilação e separação do I κ B α e do NF- κ B, sendo que este último é lançado no núcleo (Abdelli et al., 2004). Um dos genes que mais contribui para a apoptose dos ilhéus de Langerhans no ratos e que mais está associado a aumento de expressão pelo NF- κ B é o iNOS (*inducible Nitric Oxid Synthase*, indutor da óxido nítrico sintetase), o que mostra a toxicidade que este fator nuclear pode trazer às células (Abdelli et al., 2004).

Todavia, há dois mecanismos pelos quais esta via do NF- κ B pode ser ativada, a Canônica e a Alternativa. Na via de ativação Canônica, em resposta à sinalização do TNF- α e da IL-1, a subunidade I κ B β regula a fosforilação do I κ B, sendo necessário o auxílio da subunidade I κ B γ . Após esta fosforilação, o I κ B dissocia-se do NF- κ B estando este livre para exercer as suas funções pró-inflamatórias. Na via de ativação Alternativa, a subunidade I κ B α induz, sob estímulo de citocinas e quimiocinas, a fosforilação do fator de transcrição p100 (uma subunidade do NF- κ B), que se processa no seu precursor, o fator de transcrição p52, e este liga-se ao DNA, induzindo a expressão de genes envolvidos na resposta imunitária e de reações de fase aguda (Lawrence, 2009).

A nível do músculo esquelético, a ativação do NF- κ B causa perda de massa muscular e a inibição fator nuclear protege contra essa perda. Em 2005, Cai et al. verificaram no seu estudo, “a resistência à insulina local e sistêmica, resultante da ativação hepática da I κ B β e do NF- κ B”, que a perda ou proteção contra a perda da massa muscular, em função da ativação ou não destes fatores, não influenciava a resistência à insulina (Cai et al., 2005). Por outro lado, em 2011, Donath et al., reportam que a ativação dos fatores I κ B β e NF- κ B influenciam indiretamente a resistência à insulina, pelo fato de haver perda de peso corporal (Donath & Shoelson, 2011).

Nas células β dos ilhéus de Langerhans, também há ativação da via do NF- κ B, sob estímulo da glucose e da IL-1 β . A inibição da ativação do NF- κ B parece ter um papel de proteção contra a glucotoxicidade ou contra a toxicidade provocada por tratamentos com doses baixas de estreptozocina (um fármaco citotóxico alquilante utilizado no tratamento do cancro do pâncreas, bastante agressivo para as células β), de acordo com Maedler et al. (Maedler et al., 2002).

2.4.4. IL-1, um Fator Stressante

Maedler et al. reportou que elevados níveis de glicemia induzem a produção de IL-1 β que vai aumentar a expressão do receptor pró-apoptótico FAS, que por sua vez

também é induzido pela glucose (Maedler et al., 2001). As células β são extremamente sensíveis à autoestimulação da IL-1 β , muito devido à elevada produção de receptor tipo 1 da IL-1 (IL-1R1), estando assim aumentada a sinalização destas células para apoptose (Böni-Schnetzler et al., 2009). Um dos problemas aqui associados é o defeito nos mecanismos anti-inflamatórios.

No tecido adiposo de ratos magros, foi verificado um aumento da expressão de IL-1RA (*Interleukin 1 Receptor Antagonist*, Recetor Antagonista da Interleucina 1), que inibe a IL-1 das suas funções pró-inflamatórias. Já no tecido adiposo de ratos obesos essa expressão estava diminuída, estando elevada a de IL-1 β , o que mostra uma maior suscetibilidade das células β pancreáticas, em último caso, à morte celular programada (Maedler, 2004).

Os ácidos gordos livres também induzem a produção de IL-1 β (Böni-Schnetzler et al., 2008; Ehses et al., 2010). Num estudo realizado por Boni-Schenetzler, verificou-se uma ação intensificada de sinergia na produção de IL-1 β , quando para além de elevadas concentrações de ácidos gordos livres, também estavam presentes elevados níveis de glicemia (Böni-Schnetzler et al., 2009). Os ácidos gordos livres ativam diretamente os TLR2 e TLR4 (*Toll Like Receptor*), que são sensíveis à presença de lípidos, ou indiretamente através dos metabolitos dos ácidos gordos livres, as ceramidas por exemplo (Lee et al., 2001; Lee et al., 2004; Håversen et al., 2009; Ehses et al., 2010).

Na Figura 3 podemos observar como os elevados níveis de glucose nos ilhéus, vão provocar uma dissociação da TXNIP (*Thioredoxin-Interacting Protein*) da tioredoxina, estando a TXNIP disponível para se ligar à NLRP3, domínio 3 da *inflammasome*, um complexo proteico molecular que quando ativado vai induzir a produção de Caspase-1 ativada, que cliva a pró-Interleucina-1 α a pró-Interleucina-1 β , de que resulta a produção de citocinas ativas, contribuindo para o recrutamento de células imunitárias (Zhou et al., 2010; Donath & Shoelson, 2011).

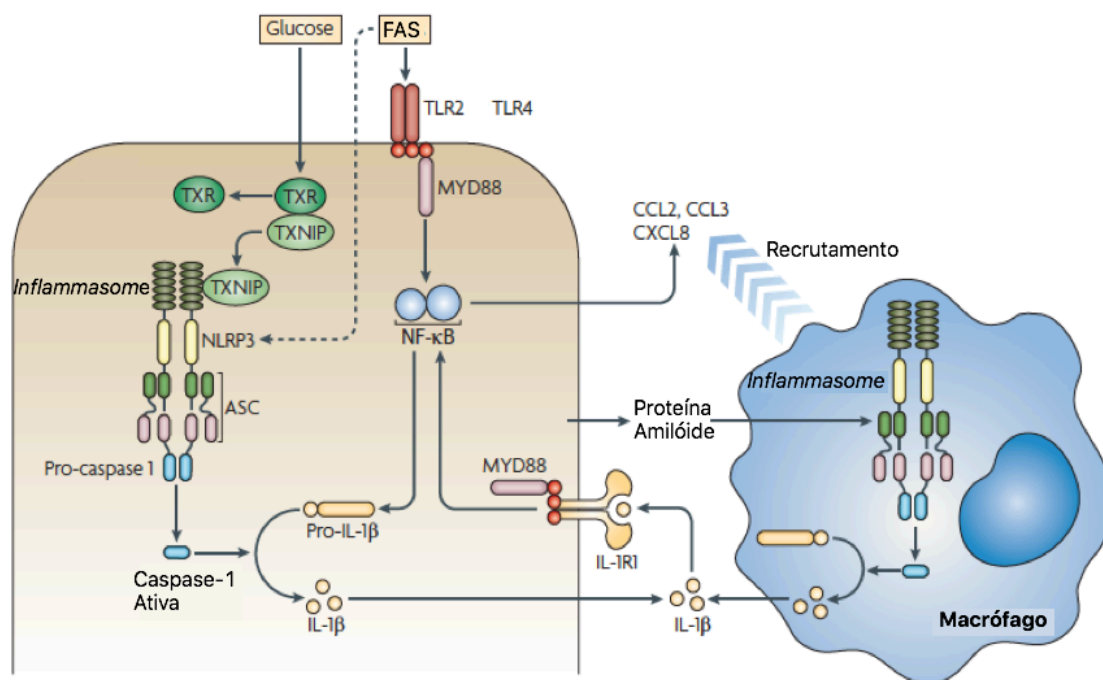


Figura 3 – A Inflamação dos Ilhéus de Langerhans, induzida pela Interleucina-1β, na Diabetes Mellitus Tipo II. Adaptado de (Mark Y. Donath & Shoelson, 2011).

2.4.5. Quimiocinas

Como já referimos, os adipócitos produzem proteínas, como MCP-1 que recrutam macrófagos da corrente sanguínea e, no caso de indivíduos obesos, expressão destas citocinas estão aumentadas (Donath & Shoelson, 2011). Para além desta importante quimiocina, outras também são encontradas no tecido adiposo de ratos obesos, nomeadamente as quimiocinas MCP-3, MCP-6, MCP-7, MCP-8 e MCP-9, sugerindo o mecanismo pelo qual a recruta de macrófagos se processa (Jiao et al., 2009).

Ao nível dos ilhéus, várias outras quimiocinas pró-inflamatórias são produzidas, na presença de elevadas concentrações de glucose e de ácidos gordos livre, como por exemplo a CXCL1 e a CXCL8 (Donath & Shoelson, 2011).

2.4.6. Adipocinas

Adipocinas são hormonas produzidas quase na exclusividade pelo tecido adiposo. A leptina e a adiponectina são exemplos de adipocinas que modulam a resposta imunitária. A adiponectina sabe-se ser uma hormona com efeitos cardioprotetores e anti-inflamatória, pela indução da produção da IL-10, anti-inflamatória, e da IL-1RA (Wolf et al., 2004; Donath & Shoelson, 2011).

No tecido adiposo de ratos obesos, formas mutadas e não funcionais da APN foram detetadas e, portanto, a contribuírem para o processo inflamatório (Donath & Shoelson, 2011).

2.5. A Diabetes Mellitus Tipo II como Alvo Anti-Inflamatório

Estudos clínicos recentes, e alguns deles já aqui referidos, em que o alvo terapêutico foi o processo inflamatório da diabetes, têm mostrado evidências científicas de bons resultados obtidos tanto na diminuição dos níveis de glucose como na melhoria da resistência à insulina. Os métodos que têm sido mais explorados são através do uso de um antagonista do TNF, de um antagonista da IL-1 β e tratamentos com derivados do ácido salicílico (Donath & Shoelson, 2011). Até à data, o uso de salicilatos tem sido o processo que melhores resultados tem exibido é a inativação da via do NF-kB, através bloqueio da ativação do recetor 1 da interleucina-1 (IL-1R1) pelo recetor antagonista da interleucina-1 (IL-1RA) ou por anticorpos específicos que inativem a dita via (Donath & Shoelson, 2011).

Por exemplo, Larsen et al., verificaram uma melhoria na secreção de insulina até 39 semanas após tratamento com IL-1RA (Larsen et al., 2009). Da mesma forma, Donath et al., em 2008, observaram que com uma única administração de um anticorpo específico para a IL-1 β houve uma diminuição dos níveis da hemoglobina glicada e um aumento da produção de insulina pelas células β pancreáticas por 3 meses” (Donath et al., 2008).

Porém, nem tudo são vantagens. Os antagonistas da IL-1 são grandes proteínas que necessitam ser injetadas, e têm efeitos secundários que podem durar de várias semanas a meses (Donath & Shoelson, 2011). Os derivados do ácido salicílico têm um tempo de semi-vida muito reduzido e são necessárias várias tomas ao dia e não são tão

Desenvolvimento

específicos como os antagonistas da IL-1, o que se prevê causarem mais efeitos secundários (Donath & Shoelson, 2011).

Assim, tendo por base a patogénese inflamatória da doença, será que o futuro do tratamento da Diabetes *Mellitus* Tipo II passa por explorar as potencialidades de moléculas endógenas verdadeiramente anti-inflamatórias, como as resolvinas?

Capítulo II: Mediadores Inflamatórios

A resolução da inflamação, que se dá a nível histológico, é um processo ativo, contrariamente ao que se pensava, uma vez que inclui vias de sinalização específicas e consequente produção local de moléculas mediadoras que participam ativamente na resolução do processo inflamatório, como por exemplo as resolvinas (C N Serhan & Chiang, 2008). Consiste, essencialmente, na troca do tipo de moléculas, de prostaglandinas e leucotrienos pro-inflamatórios para lipoxinas e outras moléculas anti-inflamatórias derivadas dos ácidos gordos poli-insaturados Ómega-3, como resolvinas das séries E e D, protectinas e maresinas (Serhan & Chiang, 2008).

Teoricamente, estes “mediadores lipídicos especializados na resolução (*Specialized Pro-resolving Lipid Mediators* - SPM) são moléculas pequenas que para além de serem agonistas da anti-inflamação, também induzem a recolha dos neutrófilos pelos macrófagos, no local de inflamação, e por isso, estão aptos à promoção da resolução do processo inflamatório” (Serhan & Chiang, 2008; Serhan & Petasis, 2011).

Os mediadores lipídicos são um “grupo de lípidos bioativos que são produzidos localmente, através de vias especializadas, em resposta a determinados estímulos. São exportados extracelularmente ligados aos recetores copulados às proteínas G, que lhes são respetivos e, no local necessário, são sequestrados através de processos enzimáticos ou não-enzimáticos” (Murakami, 2011). Naturalmente, um descontrolo nas vias de sinalização dos mediadores inflamatórios pode levar ao desenvolvimento e/ou progressão de várias doenças inflamatórias. Normalmente, aparecem em pequenas quantidades, de estrutura variada e são hidrofóbicos, devido à sua natureza lipídica (Murakami, 2011).

São três as classes de mediadores lipídicos e esta classificação é feita com base na história e na estrutura dos mesmos, como pode ser observado na Figura 4. À *Classe I* pertencem os eicosanoides derivados do ácido araquidónico (AA), como as prostaglandinas (PGs), os leucotrienos (LTs) e as respetivas famílias. Na *Classe II* estão inseridos os lisofosfolípidos e a sua família, como o fator de ativação plaquetária (FAP) e o ácido lisofosfatídico (LPA). A *Classe III*, e a que mais nos interessa, inclui os recentemente identificados mediadores lipídicos provenientes dos ácidos gordos poli-insaturados (*Polyunsaturated Fatty Acids* - PUFAs) Ómega-3, por exemplo as resolvinas da série E (RvE1 e RvE2) e da série D (RvD1, RvD2, RvD3, RvD4, RvD5 e

RvD6), derivadas do ácido eicosapentaenóico (EPA) e do ácido docosahexaenóico (DHA), respetivamente (Murakami, 2011).

A importância dos ácidos gordos polinsaturados Ómega-3 na prevenção de

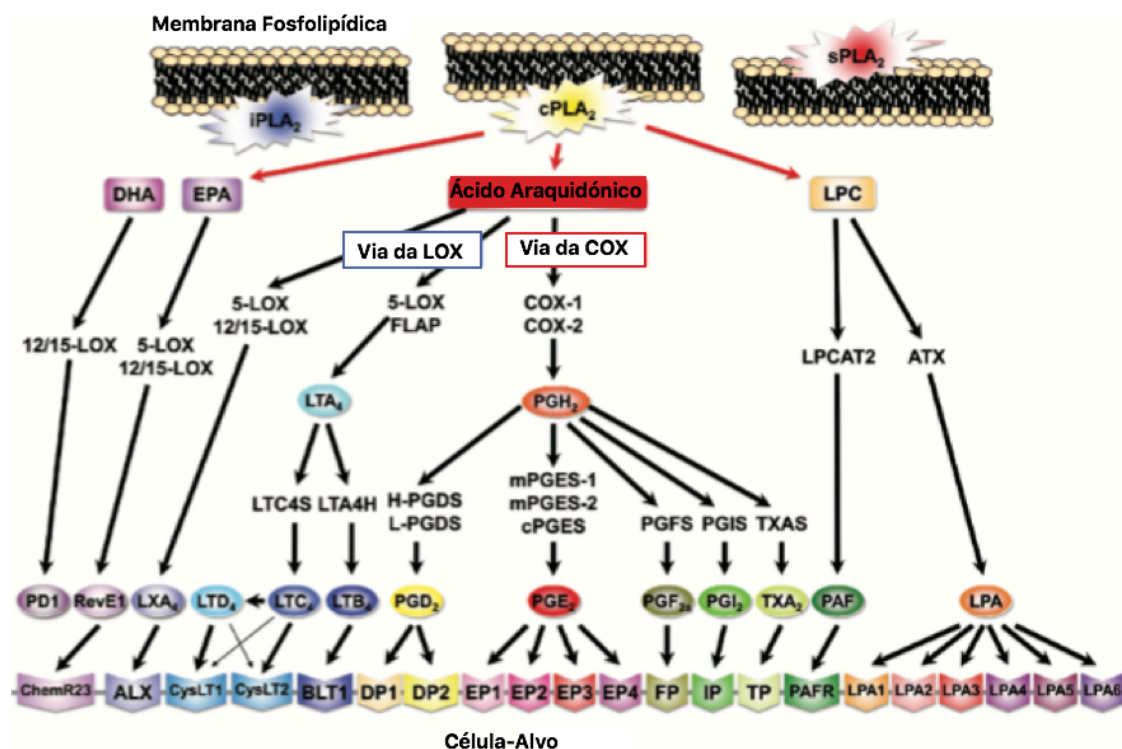


Figura 4 – Eicosanóides das Vias do Ácido Araquidónico e dos Ácidos Gordos Polinsaturados de Cadeia Longa Ómega-3. Adaptado de (M Murakami, 2011).

doenças, em roedores, foi pela primeira vez descrito em 1929, por Burr e Burr, mostrando efeitos benéficos pelo EPA e pelo DHA (Burr & Burr, 1929). Atualmente, o mecanismo pelo qual as moléculas anti-inflamatórias oriundas dos ácidos gordos polinsaturados Ómega-3 atuam na resolução da inflamação, ainda não está totalmente clarificado. Todavia, pensa-se que a chave possa estar na competição do Ómega-3 e pelo lugar do AA, na produção de eicosanóides, em que o primeiro vai bloquear a produção de eicosanóides pró-inflamatórios e promover a produção de mediadores lipídicos anti-inflamatórios. Estes “novos” mediadores lipídicos controlam a inflamação pela sua atuação direta na resolução (Serhan & Chiang, 2008).

1. Resolvinas da Série D

O ácido docosahexaenóico é, a seguir ao ácido ácido eicosapentaenóico, o maior composto do Ômega 3 e tem inúmeros efeitos benéficos. A transformação endógena do DHA em resolvinas, protectinas e maresinas, como esquematizado na Figura 5, tem confirmado o seu enorme potencial de proteção na resolução da fase aguda da resolução.

O termo “resolvina” foi pela primeira vez utilizado em 2002, por Serhan, para descrever uma molécula endógena, de estrutura diferente das já conhecidas, com potente efeitos anti-inflamatório e imunomodulador, quando utilizado em muito pequenas doses, na ordem do nanograma, nomeadamente a redução do tráfego de neutrófilos e citocinas pró-inflamatórias, assim como diminuía globalmente a resposta inflamatória (Serhan, 2002; Serhan & Chiang, 2008).

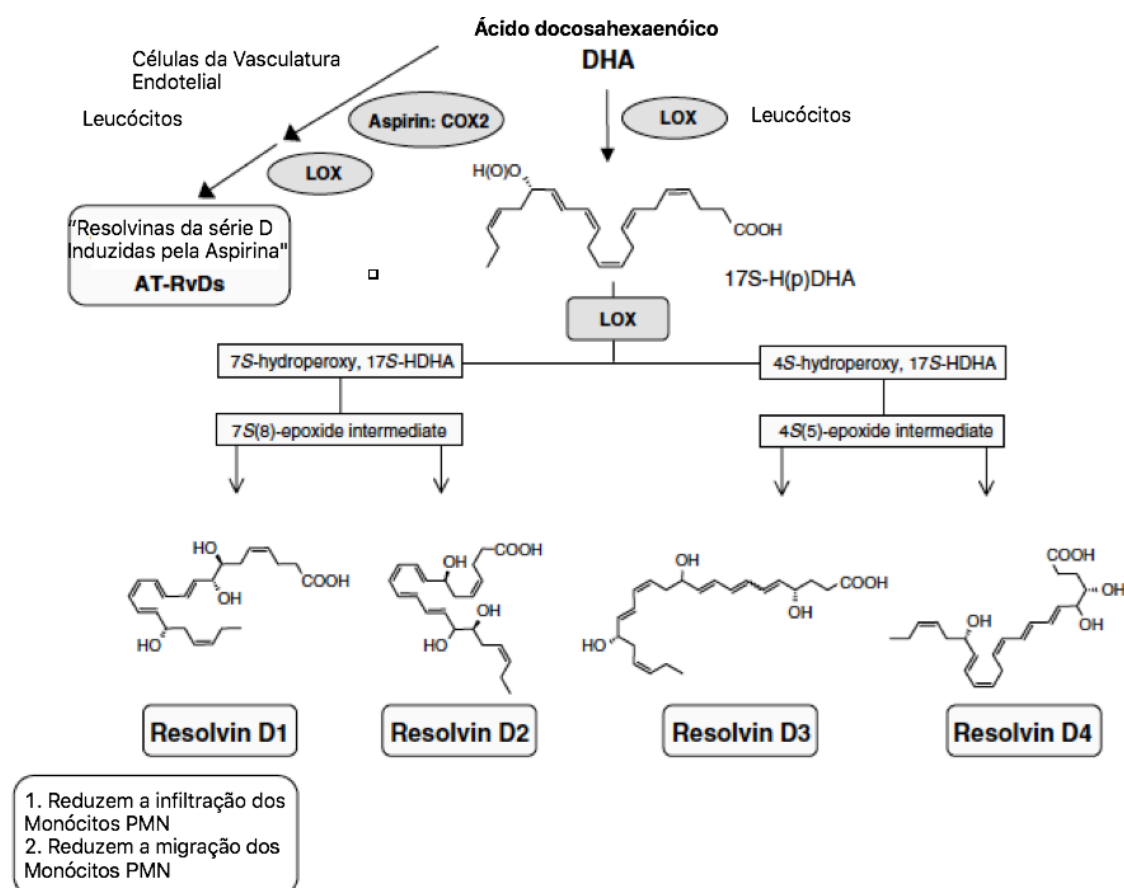


Figura 5 – Série D das Resolvinas. Adaptado de (C N Serhan & Chiang, 2008)

Em 1982, Vane percebeu que a aspirina inibia a formação das prostaglandinas e, por isso, poderia ser importante na terapêutica anti-inflamatória (Vane, 1983).

Atualmente, sabe-se que diminuem o tráfego de leucócitos aos locais de inflamação e que a aspirina atua na formação de lipoxinas, potenciando-a, durante a interação das células da vasculatura. Às lipoxinas formadas com a “ajuda” da aspirina utiliza-se a abreviatura ATL (*Aspirin-Triggered LXs*) (Serhan & Chiang, 2008).

Estas “Lipoxinas Induzidas pela Aspirina”, assim como a lipoxina A₄, são de produção bastante sensível a estímulos, atuam localmente e são facilmente inativadas por enzimas com a 15-hidroxiprostaglandina desidrogenase (15-PGDH) e pela eicosanoide oxiredutase (EOR). Neste sentido, têm sido desenvolvidos análogos com algumas modificações às estruturas nativas e que provaram ter maior tempo de semi-vida, ser ativas sob todas as formas de administração testadas (IV, IM, tópica e oral) e ter resistência à degradação enzimática (Serhan & Chiang, 2008).

1.1. Biossíntese das Resolvinas Série D e a Aspirina

As resolvinas da série D derivam do DHA, como já foi dito. Essa conversão envolve duas fases de lipoxigenação ((Serhan & Petasis, 2011).

Primeiramente, o ácido docosahexaenóico é convertido em 17-HpDA pela 15-lipoxigenase (15-LO), seguida de outra lipoxigenação pela mesma enzima, na posição C-7 e é formado um peróxido intermédio que é transformado em 7S,8S-epóxido. Uma hidrólise enzimática deste 7S,8S-epóxido converte-o nas resolvinas D1 (RvD1) e D2 (RvD2). Já uma redução do dito epóxido 7S,8S transforma-o na resolvina D5 (RvD5). Por outro lado, uma lipoxigenação na posição C-5, em vez de na C-7, pela 15-LO, biossintetiza as resolvinas D3, D4 e D6 (RvD3, RvD4 e RvD6, respetivamente), como mostra a Figura 6.

Resolvinas induzidas pela aspirina também foram identificadas, por Hong et al., em 2003 (Hong, Gronert, Devchand, Moussignac, & Serhan, 2003). Neste caso, há uma lipoxigenação na posição C-17 do DHA, na presença de aspirina, pela COX-2 (ciclo-oxigenase) acetilada pela aspirina ou pela via de um P450. Alterações enzimáticas posteriores levam à formação de resolvinas induzidas pela aspirina (AT-RvD1 – AT-RvD6), como ilustrado na Figura 5 (Serhan & Petasis, 2011).

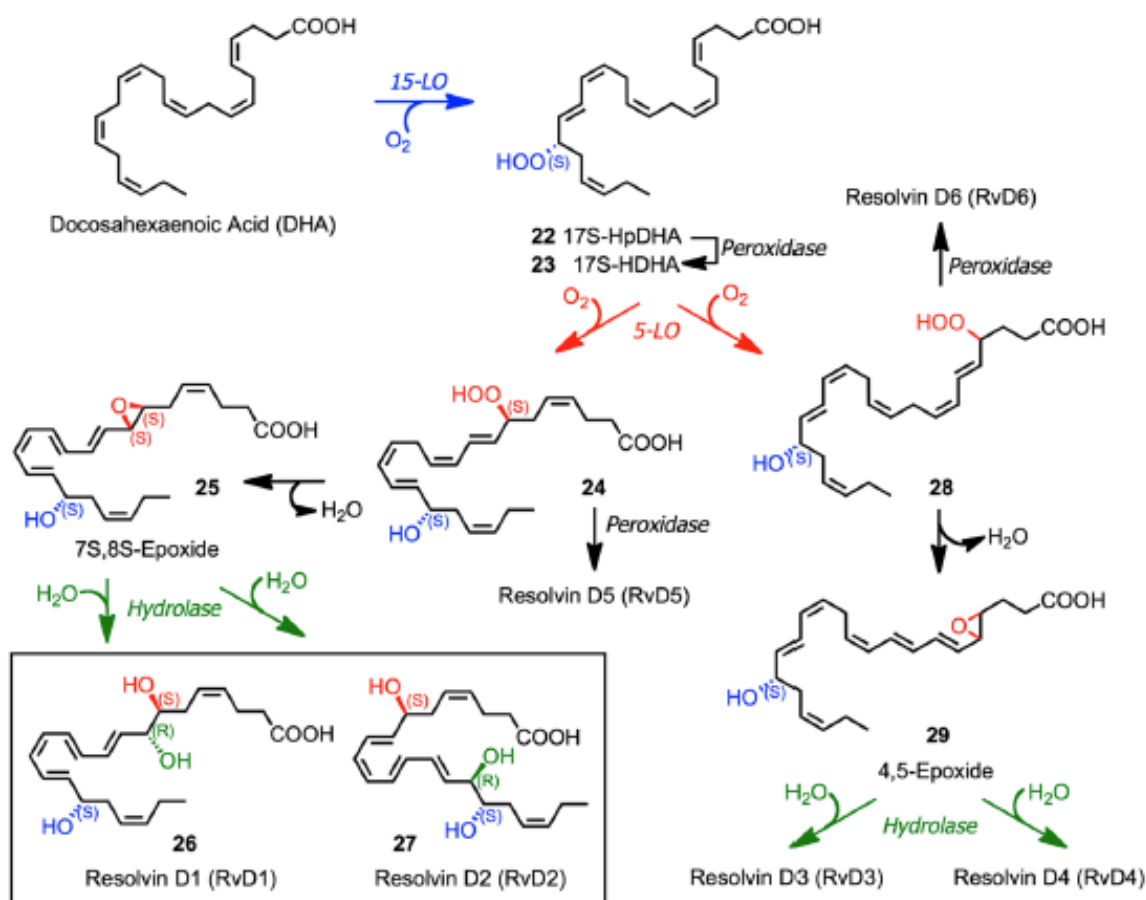


Figura 6 – Biossíntese da Série D das Resolvinas. Adaptado de (Serhan & Petasis, 2011).

1.1.1 Ações

As resolvinas da série D demonstraram ter um campo alargado de ações.

Nos microgliócitos, as RvD conseguem bloquear a transcrição da IL-1 β induzida pelo TNF- α (Serhan & Chiang, 2008). Em casos de peritonite em roedores, mostraram-se eficazes, em dose-dependente, na redução da infiltração de neutrófilos

polimorfonucleados, em cerca de 50% (Serhan, 2002). Em 2006, Duffield et al., verificaram que resolvinas da série D eram produzidas aquando de lesões isquemia/reperfusão, em que a administração destas resolvinas antes ou depois da lesão reduzia a lesão renal e a fibrose, que ocorre posteriormente à isquemia/reperfusão (Duffield et al., 2006).

As resolvinas provaram ser potentes reguladoras da movimentação trans-endotelial de neutrófilos polimorfonucleados humanos, o primeiro evento da inflamação aguda, com uma redução de cerca de 65%, tanto para a RvD1 como para a AT-RvD1, e na concentração de 1 μ M (Serhan & Chiang, 2008; Serhan & Petasis, 2011). Adicionalmente, estes mediadores lipídicos têm a capacidade de impedir a migração de neutrófilos (Serhan & Chiang, 2008).

Também se verificou que as resolvinas bloqueiam os recetores *Toll-like* ativadores de macrófagos e que reduzem a infiltração de leucócitos, em cerca de 8-10% para a RvD1 e 23% para a AT-RvD1, com uma dose de 10ng por rato, e de cerca de 35% para as duas formas, quando administrada uma dose de 100ng/rato (Serhan & Chiang, 2008; (Serhan & Petasis, 2011).

Serhan e Petasis, em 2011, mostraram como as resolvinas da série D1 conseguem ativar os recetores da lipoxina, assim como o recetor GPR32, que faz parte da família GPCR, a família de proteínas copuladoras que transporta as resolvinas, como já foi referido. Com o aumento da expressão destes recetores à superfície dos monócitos, há um favorecimento da fagocitose de neutrófilos PMN apoptóticos, de forma a “limpar” a área inflamatória e, portanto, as RvD1 interagem com os ditos recetores através de fagócitos ((Serhan & Petasis, 2011).

Por reduzirem a migração dos neutrófilos PMN humanos, há uma diminuição da polimerização da actina e um consequente bloqueio das moléculas que regula a adesão de leucotienos B₄, integrinas b2, impedindo assim que estas moléculas se instalem e perpetuem o seu efeito pró-inflamatórios ((Serhan & Petasis, 2011).

1.2. Resolvinas D1

Várias são as células e os órgãos que produzem resolvinas D1, como por exemplo os neutrófilos, o cérebro de peixe e os órgãos hematopoiéticos (Dalli et al., 2013).

Para além dos seus efeitos anti-inflamatórios, em 2013, Dalli et al. verificaram que a RvD1 tem ação na regulação e controlo da dor, tornando-se um ponto a explorar

Desenvolvimento

na terapêutica de analgesia. Este controlo é feito em várias frentes, por exemplo, da redução da inflamação das vias aéreas até à resolução do processo principal, a inflamação (Dalli et al., 2013).

Capítulo III: As Resolvinas e a Terapêutica

Atualmente, as resolvinas têm sido introduzidas como possível futuro da terapêutica de algumas doenças cardiovasculares, cancerígenas, doença de Alzheimer e da degradação muscular e, evidentemente, de doenças inflamatórias como a artrite reumatóide, a asma, doença inflamatória intestinal e a diabetes (Serhan & Petasis, 2011).

O interesse no estudo das propriedades das resolvinas começou quando em 1993, Raheja et al., relacionaram a dieta pobre em ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa ômega 3 com o aumento da incidência de distúrbios metabólicos, nomeadamente a diabetes tipo II (Raheja et al., 1993). Mais tarde, em 2006, também Psota, Gebauer e Kris-Etherton, estudaram a mesma relação entre uma dieta pobre em ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa ômega 3 e o aumento da incidência de doença cardiovascular (Psota, Gebauer & Kris-Etherton, 2006).

Porém, em 2009, Buckley et al. levantaram questão, em relação à diabetes tipo II e aos ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa ômega 3, que ainda não está totalmente esclarecida. As hipóteses prováveis seriam que os PUFA de cadeia longa ômega 3 têm uma ação preventiva no ganho de peso, sendo *per si* causa de melhoria na resistência à utilização da insulina, dado que a obesidade diminui a biossíntese de resolvinas e de protectinas, ou pelas propriedades anti-inflamatórias dos mediadores lipídicos, derivados dos ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa ômega 3 (Buckley & Howe, 2009; White et al., 2010).

Particularmente no caso das resolvinas D1, há pouca investigação que relaciona os possíveis benefícios da sua utilização em diabéticos tipo II. Em 2011, Hellmann et al. demonstraram que as “Resolvinas D1 diminuem a acumulação de macrófagos no tecido adiposo e melhoram a sensibilidade à inulina em ratos obesos diabéticos” (Hellmann et al., 2011).

Neste estudo é através de ratos geneticamente modificados no gene *fat-1* (com a sua expressão aumentada) que se pesquisa a produção de resolvinas. Este gene, que não é encontrado em mamíferos, codifica uma enzima-desnaturase que vai converter os ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa ômega 6 em ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa ômega 3. Estes últimos diferenciam-se em EPA e DHA, sendo que o DHA sofre uma hidrólise e se transforma em 17-HDHA. Este 17-HDHA é considerado um biomarcador da via de biossíntese das resolvinas, no tecido adiposo de ratos obesos

diabéticos (White et al., 2010). O gene *fat-1* é responsável por um aumento de 138% da produção de resolvinas pela via do 17-HDHA (White et al., 2010).

Baseando-nos no conhecimento científico atual que reunimos nesta monografia, percebemos, que a inflamação das células β pancreáticas diminui a produção de insulina por mecanismos como o *stress* oxidativo, deposição da proteína amiloide no pâncreas, lipotoxicidade e glucotoxicidade, induzidos pelo excesso de ácidos gordos e glucose em circulação, oriundos da dieta. A distribuição da gordura corporal e o IMC são fatores que afetam a resistência à insulina, pelas moléculas pró-inflamatórias que os adipócitos secretam e que recrutam células imunitárias ou que marcam as células para apoptose, o que agrava o processo inflamatório. Na diabetes tipo II como uma doença inflamatória, a hipoxia e a morte celular, pela recruta de macrófagos, produção de moléculas pró-inflamatórias e necessidade de remoção de detritos celular, parecem ter um papel preponderante no entendimento da patogénese da doença. A ativação da via do JNK pela glucose, e por citocinas induzidas pela glucose, vai levar à diminuição da produção de insulina, para além de estar implicada indiretamente na diferenciação, maturação e desenvolvimento das células β pancreáticas. Sabe-se que a JNK tem um papel importante na resposta imunitária e apoptose, o que confirma a sua natureza pró-inflamatória. O NF-kB é uma molécula pró-inflamatória que se encontra no seu estado inativo no citosol. Aquando da ativação da via do NF-kB, por meio do bloqueio do seu inibidor, esta molécula induz a expressão de genes envolvidos na resposta imunitária e de reações de fase aguda. Elevados níveis glicémicos induzem a produção de IL-1 β , que vai estimular a produção do recetor pró-apoptótico FAS nas células β pancreáticas, estando assim aumentada a sinalização destas células para apoptose. Esta morte celular programada tanto diminui a capacidade das células β produzirem de insulina, como é fator de desenvolvimento do processo inflamatório pelas moléculas pró-inflamatórias e pelas células imunitárias envolvidas. Concluimos que a inflamação é um processo chave no desenvolvimento da diabetes tipo II e é neste processo que pensamos que as resolvinas D1 possam ser vantajosas.

As resolvinas são moléculas relativamente recentes e, embora a sua biossínteses e funções estejam descritas, pouco mais se sabe acerca dos mecanismos através dos quais atuam. Porém, há um elevado entusiasmo entre a comunidade científica sobre esta nova classe de moléculas, os mediadores lipídicos, uma vez que poderão ter um papel essencial no tratamento de várias doenças, inflamatórias e não só. Estudámos estes

mediadores lipídicos e a sua função na resolução da inflamação. Sabendo que a inflamação é um processo ativo, existe efetivamente uma troca de moléculas pró-inflamatórias, como prostaglandinas e leucotrienos, por uma classe de moléculas anti-inflamatórias, como as resolvinas e as protectinas, oriundas dos ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa ómega 3. As resolvinas D1 derivam do DHA, convertido a partir dos ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa ómega 3, por um processo que envolve duas etapas de lipoxigenação. De entre as suas funções, destacam-se a capacidade de regulação da movimentação trans-endotelial dos neutrófilos PMN, bloqueio de recetores *Toll-like*, ativadores de macrófagos e a redução da infiltração de leucócitos. Podemos assim concluir acerca da competência destas moléculas para resolução da inflamação.

Existem poucos estudos que relacionam a Diabetes *Mellitus* Tipo II, no fundo a resistência à insulina, com as Resolvinas D1 e é arriscado concluir que será seguramente uma terapêutica eficaz no futuro (Hellmann et al., 2011). Os investigadores obtiveram alguns resultados que não conseguem ainda explicar, uma vez que não se conhece totalmente estes mediadores lipídicos. Um desses resultados foi acerca dos níveis de APN em circulação, que se encontraram diminuídos no grupo controlo ao fim de 17 dias. Um outro foi a acerca da expressão de IL-10, que se manteve inalterada. quando a APN e a proteína MGL-1, utilizada como biomarcador do fenótipo M2 dos macrófagos do tecido adiposo obeso, são indutoras da produção e secreção desta interleucina.

Todavia, os resultados apresentados por Hellmann et al. são francamente promissores. Neste estudo, os investigadores procuraram perceber se havia, e qual, efeito das resolvinas D1 na tolerância à glucose e resistência à insulina, nas CLS dos macrófagos, no rácio entre o fenótipo M1 e M2 dos macrófagos, na expressão do recetor das resolvinas, *Fpr2*, nas células do tecido adiposo e, por último, na expressão de adiponectinas. Hellmann et al. demonstraram, ao fim de 9 e 17 dias com uma administração diária de 2µg de resolvinas D1 por cada kg de peso corporal, que os níveis de hemoglobina glicada diminuíram e que a homeostase começou a ser reposta, findo o referido período; verificaram uma diminuição da quantidade de macrófagos, e consequente quantidade de CLS, nos ratos tratados com RvD1; constataram que houve um *switch* no fenótipo dos macrófagos presentes no tecido adiposo obeso, de M1 para M2 e que a expressão de IL-6 (pró-inflamatória) está diminuída, no grupo em que foram administradas resolvinas D1. No mesmo estudo, os investigadores observaram que a

expressão do recetor das resolvinas está aumentada. Dado que estes recetores são expressos à superfície dos adipócitos, e onde se encontram macrófagos, é de salientar que foi comprovada a função das resolvinas D1 de bloquear a acumulação de macrófagos. Por último, Hellmann et al. observaram que as resolvinas D1 causam um aumento dos níveis de adiponectina em circulação, sugerindo que o processo inflamatório começa a ser resolvido.

Em suma, Neste trabalho as resolvinas D1 são propostas como um futuro da terapêutica da diabetes tipo II, sendo necessários mais estudos com evidência científica clara.

4. Referências Bibliográficas

- Abdelli, S., Ansite, J., Roduit, R., Borsello, T., Matsumoto, I., Sawada, T., ... Bonny, C. (2004). Intracellular Stress Signaling Pathways Activated During Human Islet Preparation and Following Acute Cytokine Exposure. *Diabetes*, 53(11), 2815–2823. <http://doi.org/10.2337/diabetes.53.11.2815>
- Adair, T. H., & Montani, J.-P. (2010). Overview of Angiogenesis. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53238/>
- Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R., & White, M. F. (2000). The c-Jun NH2-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser307. *Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 9047–9054. <http://doi.org/10.1074/jbc.275.12.9047>
- Al-Goblan, A. S., Al-Alfi, M. A., & Khan, M. Z. (2014). Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 7, 587–591. <http://doi.org/10.2147/DMSO.S67400>
- Baecher-Allan, C., & Hafler, D. A. (2006). Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunological Reviews*, 212(1), 203–216. <http://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00417.x>
- Beagley, J., Guariguata, L., Weil, C., & Motala, A. A. (2014). Global estimates of undiagnosed diabetes in adults. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 103(2), 150–160. <http://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.11.001>
- Bennett, B. L., Sasaki, D. T., Murray, B. W., O'Leary, E. C., Sakata, S. T., Xu, W., ... Anderson, D. W. (2001). SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24), 13681–13686. <http://doi.org/10.1073/pnas.251194298>
- Böni-Schnetzler, M., Boller, S., Debray, S., Bouzakri, K., Meier, D. T., Prazak, R., ... Donath, M. Y. (2009). Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I. *Endocrinology*, 150(12), 5218–5229. <http://doi.org/10.1210/en.2009-0543>
- Böni-Schnetzler, M., Thorne, J., Parnaud, G., Marselli, L., Ehses, J. A., Kerr-Conte, J., ... Donath, M. Y. (2008). Increased Interleukin (IL)-1 β Messenger Ribonucleic Acid Expression in β -Cells of Individuals with Type 2 Diabetes and Regulation of IL-1 β in Human Islets by Glucose and Autostimulation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(10), 4065–4074.

<http://doi.org/10.1210/jc.2008-0396>

- Bonner-Weir, S., Trent, D. F., & Weir, G. C. (1983). Partial pancreatectomy in the rat and subsequent defect in glucose-induced insulin release. *Journal of Clinical Investigation*, 71(6), 1544–1553.
- Buckley, J. D., & Howe, P. R. C. (2009). Anti-obesity effects of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 10(6), 648–659. <http://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2009.00584.x>
- Burke, B., Giannoudis, A., Corke, K. P., Gill, D., Wells, M., Ziegler-Heitbrock, L., & Lewis, C. E. (2003). Hypoxia-Induced Gene Expression in Human Macrophages. *The American Journal of Pathology*, 163(4), 1233–1243.
- Burr, G. O., & Burr, M. M. (1929). A New Deficiency Disease Produced by the Rigid Exclusion of Fat from the Diet. *Journal of Biological Chemistry*, 82(2), 345–367.
- Cai, D., Yuan, M., Frantz, D. F., Melendez, P. A., Hansen, L., Lee, J., & Shoelson, S. E. (2005). Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *Nature Medicine*, 11(2), 183–190. <http://doi.org/10.1038/nm1166>
- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., ... Obin, M. S. (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of Lipid Research*, 46(11), 2347–2355. <http://doi.org/10.1194/jlr.M500294-JLR200>
- Dalli, J., Winkler, J. W., Colas, R. A., Arnardottir, H., Cheng, C.-Y. C., Chiang, N., ... Serhan, C. N. (2013). Resolvin D3 and Aspirin-Triggered Resolvin D3 Are Potent Immunoresolvents. *Chemistry & Biology*, 20(2), 188–201. <http://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.11.010>
- Dinarello, C. A. (2009). Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 519–550. <http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>
- Donath, M. Y., Gross, D. J., Cerasi, E., & Kaiser, N. (1999). Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of Psammomys obesus during development of diabetes. *Diabetes*, 48(4), 738–744.
- Donath, M. Y., & Shoelson, S. E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*, 11(2), 98–107. <http://doi.org/10.1038/nri2925>

- Duffield, J. S., Hong, S., Vaidya, V. S., Lu, Y., Fredman, G., Serhan, C. N., & Bonventre, J. V. (2006). Resolvin D Series and Protectin D1 Mitigate Acute Kidney Injury. *The Journal of Immunology*, 177(9), 5902–5911. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.177.9.5902>
- Ebstein, W. (1876). Zur therapie des Diabetes mel- litus, insbesondere über die Anwendung des sali- cylauren Natron bei demselben. *Berliner Klinische Wochenschrift.* 13:337–340
- Ehses, J. A., Meier, D. T., Wueest, S., Rytka, J., Boller, S., Wielinga, P. Y., ... Donath, M. Y. (2010). Toll-like receptor 2-deficient mice are protected from insulin resistance and beta cell dysfunction induced by a high-fat diet. *Diabetologia*, 53(8), 1795–1806. <http://doi.org/10.1007/s00125-010-1747-3>
- Ehses, J. A., Perren, A., Eppler, E., Ribaux, P., Pospisilik, J. A., Maor-Cahn, R., ... Donath, M. Y. (2007). Increased Number of Islet-Associated Macrophages in Type 2. *Diabetes*, 56(9), 2356–2370. <http://doi.org/10.2337/db06-1650>
- Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., ... Mathis, D. (2009). Fat Treg cells: a liaison between the immune and metabolic systems. *Nature Medicine*, 15(8), 930–939. <http://doi.org/10.1038/nm.2002>
- Geiss, L. S., Wang, J., Cheng, Y. J., Thompson, T. J., Barker, L., Li, Y., ... Gregg, E. W. (2014). Prevalence and incidence trends for diagnosed diabetes among adults aged 20 to 79 years, United States, 1980-2012. *JAMA*, 312(12), 1218–1226. <http://doi.org/10.1001/jama.2014.11494>
- Guariguata, L., Whiting, D. R., Hambleton, I., Beagley, J., Linnenkamp, U., & Shaw, J. E. (2014). Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 103(2), 137–149. <http://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.11.002>
- Håversen, L., Danielsson, K. N., Fogelstrand, L., & Wiklund, O. (2009). Induction of proinflammatory cytokines by long-chain saturated fatty acids in human macrophages. *Atherosclerosis*, 202(2), 382–393. <http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.05.033>
- Hellmann, J., Tang, Y., Kosuri, M., Bhatnagar, A., & Spite, M. (2011). Resolvin D1 decreases adipose tissue macrophage accumulation and improves insulin sensitivity in obese-diabetic mice. *The FASEB Journal*, 25(7), 2399–2407. <http://doi.org/10.1096/fj.10-178657>
- Herder, C., Brunner, E. J., Rathmann, W., Strassburger, K., Tabák, A. G., Schloot, N.

- C., & Witte, D. R. (2009). Elevated Levels of the Anti-Inflammatory Interleukin-1 Receptor Antagonist Precede the Onset of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 32(3), 421–423. <http://doi.org/10.2337/dc08-1161>
- Herder, C., Illig, T., Rathmann, W., Martin, S., Haastert, B., Müller-Scholze, S., ... Kolb, H. (2005). Inflammation and Type 2 Diabetes: Results from KORA Augsburg. *Das Gesundheitswesen*, 67(S 01), 115–121. <http://doi.org/10.1055/s-2005-858252>
- Herrero, L., Shapiro, H., Nayer, A., Lee, J., & Shoelson, S. E. (2010). Inflammation and adipose tissue macrophages in lipodystrophic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(1), 240–245. <http://doi.org/10.1073/pnas.0905310107>
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Görgün, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., ... Hotamisligil, G. S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 420(6913), 333–336. <http://doi.org/10.1038/nature01137>
- Hong, S., Gronert, K., Devchand, P. R., Moussignac, R.-L., & Serhan, C. N. (2003). Novel Docosatrienes and 17S-Resolvins Generated from Docosahexaenoic Acid in Murine Brain, Human Blood, and Glial Cells AUTACOIDS IN ANTI-INFLAMMATION. *Journal of Biological Chemistry*, 278(17), 14677–14687. <http://doi.org/10.1074/jbc.M300218200>
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., & Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5091), 87–91.
- Ilan, Y., Maron, R., Tukupah, A.-M., Maioli, T. U., Murugaiyan, G., Yang, K., ... Weiner, H. L. (2010). Induction of regulatory T cells decreases adipose inflammation and alleviates insulin resistance in ob/ob mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(21), 9765–9770. <http://doi.org/10.1073/pnas.0908771107>
- INE. 2014. Óbitos por Causa de Morte. PORDATA. Recuperado a Setembro 2, 2015
- Jiao, P., Chen, Q., Shah, S., Du, J., Tao, B., Tzamelis, I., ... Xu, H. (2009). Obesity-Related Upregulation of Monocyte Chemotactic Factors in Adipocytes. *Diabetes*, 58(1), 104–115. <http://doi.org/10.2337/db07-1344>
- J S Lewis, J. L. (1999). Macrophage responses to hypoxia: Relevance to disease mechanisms. *Journal of Leukocyte Biology*, 66(6), 889–900.
- Kaneto, H., Xu, G., Fujii, N., Kim, S., Bonner-Weir, S., & Weir, G. C. (2002). Involvement of c-Jun N-terminal Kinase in Oxidative Stress-mediated

- Suppression of Insulin Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*, 277(33), 30010–30018. <http://doi.org/10.1074/jbc.M202066200>
- Karpe, F., Dickmann, J. R., & Frayn, K. N. (2011). Fatty Acids, Obesity, and Insulin Resistance: Time for a Reevaluation. *Diabetes*, 60(10), 2441–2449. <http://doi.org/10.2337/db11-0425>
- Kathrin Maedler, P. S. (2004). Leptin modulates β cell expression of IL-1 receptor antagonist and release of IL-1 β in human islets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(21), 8138–43. <http://doi.org/10.1073/pnas.0305683101>
- Kosteli, A., Sgaru, E., Haemmerle, G., Martin, J. F., Lei, J., Zechner, R., & Ferrante, A. W. (2010). Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(10), 3466–3479. <http://doi.org/10.1172/JCI42845>
- Larsen, C. M., Faulenbach, M., Vaag, A., Ehses, J. A., Donath, M. Y., & Mandrup-Poulsen, T. (2009). Sustained Effects of Interleukin-1 Receptor Antagonist Treatment in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 32(9), 1663–1668. <http://doi.org/10.2337/dc09-0533>
- Lawrence, T. (2009). The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(6). <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>
- Leahy, J. L., Cooper, H. E., Deal, D. A., & Weir, G. C. (1986). Chronic hyperglycemia is associated with impaired glucose influence on insulin secretion. A study in normal rats using chronic in vivo glucose infusions. *Journal of Clinical Investigation*, 77(3), 908–915.
- Lee, J. Y., Sohn, K. H., Rhee, S. H., & Hwang, D. (2001). Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(20), 16683–16689. <http://doi.org/10.1074/jbc.M011695200>
- Lee, J. Y., Zhao, L., Youn, H. S., Weatherill, A. R., Tapping, R., Feng, L., ... Hwang, D. H. (2004). Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 16971–16979. <http://doi.org/10.1074/jbc.M312990200>
- Liu, J., Divoux, A., Sun, J., Zhang, J., Clément, K., Glickman, J. N., ... Shi, G.-P.

- (2009a). Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nature Medicine*, 15(8), 940–945. <http://doi.org/10.1038/nm.1994>
- Liu, J., Divoux, A., Sun, J., Zhang, J., Clément, K., Glickman, J. N., ... Shi, G.-P. (2009b). Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nature Medicine*, 15(8), 940–945. <http://doi.org/10.1038/nm.1994>
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., & Saltiel, A. R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation*, 117(1), 175–184. <http://doi.org/10.1172/JCI29881>
- Lumeng, C. N., DelProposto, J. B., Westcott, D. J., & Saltiel, A. R. (2008). Phenotypic Switching of Adipose Tissue Macrophages With Obesity Is Generated by Spatiotemporal Differences in Macrophage Subtypes. *Diabetes*, 57(12), 3239–3246. <http://doi.org/10.2337/db08-0872>
- Lumeng, C. N., DeYoung, S. M., Bodzin, J. L., & Saltiel, A. R. (2007). Increased Inflammatory Properties of Adipose Tissue Macrophages Recruited During Diet-Induced Obesity. *Diabetes*, 56(1), 16–23. <http://doi.org/10.2337/db06-1076>
- Lumeng, C. N., Deyoung, S. M., & Saltiel, A. R. (2007). Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 292(1), E166–E174. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00284.2006>
- Maedler, K., Oberholzer, J., Bucher, P., Spinas, G. A., & Donath, M. Y. (2003). Monounsaturated Fatty Acids Prevent the Deleterious Effects of Palmitate and High Glucose on Human Pancreatic β -Cell Turnover and Function. *Diabetes*, 52(3), 726–733. <http://doi.org/10.2337/diabetes.52.3.726>
- Maedler, K., Sergeev, P., Ris, F., Oberholzer, J., Joller-Jemelka, H. I., Spinas, G. A., ... Donath, M. Y. (2002). Glucose-induced β cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(6), 851–860. <http://doi.org/10.1172/JCI15318>
- Maedler, K., Spinas, G. A., Dyntar, D., Moritz, W., Kaiser, N., & Donath, M. Y. (2001). Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. *Diabetes*, 50(1), 69–76.
- Maedler, K., Spinas, G. A., Lehmann, R., Sergeev, P., Weber, M., Fontana, A., ... Donath, M. Y. (2001). Glucose Induces β -Cell Apoptosis Via Upregulation of

- the Fas Receptor in Human Islets. *Diabetes*, 50(8), 1683–1690.
<http://doi.org/10.2337/diabetes.50.8.1683>
- Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports*, 6.
<http://doi.org/10.12703/P6-13>
- Masters, S. L., Dunne, A., Subramanian, S. L., Hull, R. L., Tannahill, G. M., Sharp, F. A., ... O'Neill, L. A. J. (2010). Activation of the Nlrp3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes. *Nature Immunology*, 11(10), 897–904. <http://doi.org/10.1038/ni.1935>
- Murakami, M. (2011). Lipid mediators in life science. *Experimental Animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*, 60(1), 7–20.
- M. Y. Donath, & et al. (2008). XOMA 052, an anti-IL-1 β antibody, in a double-blind, placebo-controlled, dose escalation study of the safety and pharmacokinetics in patients with type 2 diabetes mellitus – a new approach to therapy. *Diabetologia*, 51, 51.
- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., ... Nagai, R. (2009). CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature Medicine*, 15(8), 914–920.
<http://doi.org/10.1038/nm.1964>
- Pickup, J. C., Mattock, M. B., Chusney, G. D., & Burt, D. (1997). NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia*, 40(11), 1286–1292.
<http://doi.org/10.1007/s001250050822>
- Poitout, V., & Robertson, R. P. (2008). Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocrine Reviews*, 29(3), 351–366.
<http://doi.org/10.1210/er.2007-0023>
- Prentki, M., & Corkey, B. E. (1996). Are the β -Cell Signaling Molecules Malonyl-CoA and Cystolic Long-Chain Acyl-CoA Implicated in Multiple Tissue Defects of Obesity and NIDDM? *Diabetes*, 45(3), 273–283.
<http://doi.org/10.2337/diab.45.3.273>
- Psota, T. L., Gebauer, S. K., & Kris-Etherton, P. (2006). Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk. *The American Journal of Cardiology*, 98(4A), 3i–18i. <http://doi.org/10.1016/j.amjcard.2005.12.022>

- Raheja, B. S., Sadikot, S. M., Phatak, R. B., & Rao, M. B. (1993). Significance of the N-6/N-3 ratio for insulin action in diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 683, 258–271.
- Reaven, G. M., Hollenbeck, C., Jeng, C. Y., Wu, M. S., & Chen, Y. D. (1988). Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes*, 37(8), 1020–1024.
- Reid J, Macdougall AI, Andrews MM. (1957). On the efficacy of salicylate in treating diabetes mellitus. *Br Med J*. 2:1071–1074.
- Roncarolo, M.-G., & Battaglia, M. (2007). Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nature Reviews Immunology*, 7(8), 585–598. <http://doi.org/10.1038/nri2138>
- Serhan, C. N. (2002). Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin biosynthesis: an update and role in anti-inflammation and pro-resolution. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68–69, 433–455. [http://doi.org/10.1016/S0090-6980\(02\)00047-3](http://doi.org/10.1016/S0090-6980(02)00047-3)
- Serhan, C. N., & Chiang, N. (2008). Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. *British Journal of Pharmacology*, 153(Suppl 1), S200–S215. <http://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707489>
- Serhan, C. N., & Petasis, N. A. (2011). Resolvins and Protectins in Inflammation-Resolution. *Chemical Reviews*, 111(10), 5922–5943. <http://doi.org/10.1021/cr100396c>
- Shao, J., Yamashita, H., Qiao, L., & Friedman, J. E. (2000). Decreased Akt kinase activity and insulin resistance in C57BL/KsJ-Leprdb/db mice. *Journal of Endocrinology*, 167(1), 107–115. <http://doi.org/10.1677/joe.0.1670107>
- Shaul, M. E., Bennett, G., Strissel, K. J., Greenberg, A. S., & Obin, M. S. (2010). Dynamic, M2-Like Remodeling Phenotypes of CD11c+ Adipose Tissue Macrophages During High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice. *Diabetes*, 59(5), 1171–1181. <http://doi.org/10.2337/db09-1402>
- Shoelson, S. E., Lee, J., & Goldfine, A. B. (2006). Inflammation and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 116(7), 1793–1801. <http://doi.org/10.1172/JCI29069>
- Siervo, M., Montagnese, C., Mathers, J. C., Soroka, K. R., Stephan, B. C. M., & Wells, J. C. K. (2014). Sugar consumption and global prevalence of obesity and hypertension: an ecological analysis. *Public Health Nutrition*, 17(3), 587–596.

- <http://doi.org/10.1017/S1368980013000141>
- Spranger, J., Kroke, A., Möhlig, M., Hoffmann, K., Bergmann, M. M., Ristow, M., ... Pfeiffer, A. F. H. (2003). Inflammatory Cytokines and the Risk to Develop Type 2 Diabetes Results of the Prospective Population-Based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes*, 52(3), 812–817. <http://doi.org/10.2337/diabetes.52.3.812>
- Strissel, K. J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J. W., DeFuria, J., Jick, Z., ... Obin, M. S. (2007). Adipocyte Death, Adipose Tissue Remodeling, and Obesity Complications. *Diabetes*, 56(12), 2910–2918. <http://doi.org/10.2337/db07-0767>
- Unger, R. H. (1995). Lipotoxicity in the Pathogenesis of Obesity-Dependent NIDDM: Genetic and Clinical Implications. *Diabetes*, 44(8), 863–870. <http://doi.org/10.2337/diab.44.8.863>
- Vane, J. R. (1983). Adventures and excursions in bioassay: the stepping stones to prostacyclin. *British Journal of Pharmacology*, 79(3), 821–838.
- Walker, K. Z., O'Dea, K., Johnson, L., Sinclair, A. J., Piers, L. S., Nicholson, G. C., & Muir, J. G. (1996). Body fat distribution and non-insulin-dependent diabetes: comparison of a fiber-rich, high-carbohydrate, low-fat (23%) diet and a 35% fat diet high in monounsaturated fat. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 63(2), 254–260.
- Weir, G. C., & Bonner-Weir, S. (2004). Five Stages of Evolving Beta-Cell Dysfunction During Progression to. *Diabetes*, 53(suppl 3), S16–S21. http://doi.org/10.2337/diabetes.53.suppl_3.S16
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1796–1808. <http://doi.org/10.1172/JCI19246>
- White, P. J., Arita, M., Taguchi, R., Kang, J. X., & Marette, A. (2010). Transgenic Restoration of Long-Chain n-3 Fatty Acids in Insulin Target Tissues Improves Resolution Capacity and Alleviates Obesity-Linked Inflammation and Insulin Resistance in High-Fat-Fed Mice. *Diabetes*, 59(12), 3066–3073. <http://doi.org/10.2337/db10-0054>
- Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Tournier, C., Yasuda, J., & Davis, R. J. (1998). A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5383), 1671–1674.

- Williamson, R. T. (1901). On the Treatment of Glycosuria and Diabetes Mellitus with Sodium Salicylate. *British Medical Journal*, 1(2100), 760–762.
- Wolf, A. M., Wolf, D., Rumpold, H., Enrich, B., & Tilg, H. (2004). Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 323(2), 630–635. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.145>
- Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., ... Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1821–1830. <http://doi.org/10.1172/JCI200319451>
- Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I., & Tschopp, J. (2010). Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nature Immunology*, 11(2), 136–140. <http://doi.org/10.1038/ni.1831>
- Zraika, S., Hull, R. L., Verchere, C. B., Clark, A., Potter, K. J., Fraser, P. E., ... Kahn, S. E. (2010). Toxic oligomers and islet beta cell death: guilty by association or convicted by circumstantial evidence? *Diabetologia*, 53(6), 1046–1056. <http://doi.org/10.1007/s00125-010-1671-6>